临床诊疗指南

免疫学分册

中华医学会　编著

人民卫生出版社

策划编辑　杜　贤　姚　冰
　　周春桃　刘　盛

责任编辑　卢　媛

封面设计　郭　淼

版式设计　何美玲

责任校对　李秋斋

ISBN 978-7-117-08894-7

9 787117 088947 >

定　价：　25.00　元

临床诊疗指南

免疫学分册

中华医学会　编著

人民卫生出版社

图书在版编目（CIP）数据

临床诊疗指南·免疫学分册/中华医学会编著.
—北京：人民卫生出版社，2008.1
ISBN 978-7-117-08894-7

Ⅰ.临… Ⅱ.中… Ⅲ.①临床医学-指南 ②免疫学-指南 Ⅳ.R4-62 R392-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2007）第 097556 号

策划编辑 杜 贤 姚 冰
周春桃 刘 盛
责任编辑 赵 博
封面设计 郭 淼
版式设计 何美玲
责任校对 李秋斋

临 床 诊 疗 指 南

免 疫 学 分 册

编　　著：中华医学会
出版发行：人民卫生出版社（中继线 010-67616688）
地　　址：北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼
邮　　编：100078
网　　址：http：//www.pmph.com
E - mail：pmph @ pmph.com
购书热线：010 - 67605754　010-65264830
印　　刷：三河市宏达印刷有限公司
经　　销：新华书店
开　　本：787 × 1092　1/16　　**印张**：13.5
字　　数：240 千字
版　　次：2008 年 1 月第 1 版　2008 年 1 月第 1 版第 1 次印刷
标准书号：ISBN 978-7-117-08894-7/R · 8895
定　　价：25.00 元

内容提要

《临床诊疗指南·免疫学分册》系卫生部委托中华医学会，由中华医学会免疫学分会组织全国著名免疫学专家编写而成。全书共10章，分别为免疫学概论、免疫学常用检验技术与质量控制、固有免疫（天然免疫）功能分析、免疫球蛋白、细胞免疫功能分析、MHC-HLA分析、超敏反应（变态反应）与免疫缺陷病、自身免疫性疾病的抗体分析、肿瘤标志、传染病的免疫学检验等。本书强调实用性和先进性，不仅介绍了临床医生需要的临床免疫学分析相关指标，亦反映了临床免疫学分析的学科新进展，对临床医务人员和相关医务工作者全面而准确地认识临床免疫学，有一定的指导意义。

序

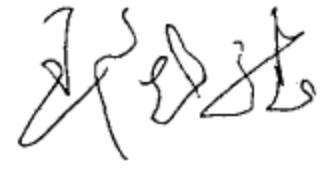
在卫生部的领导和财政部的支持下，由中华医学会、中华口腔医学会、中华护理学会组织50多个专科分会的近千名医学专家编写的《临床诊疗指南》问世了。作为一名卫生管理工作者和医务工作者，我感到由衷的高兴，并热烈祝贺我国《临床诊疗指南》的出版。

随着医学科学技术的飞速发展和人民群众对医疗卫生工作要求的不断提高，无论是卫生管理部门还是广大临床医务人员，都希望能有一部全国权威性的学术著作，指导和规范临床医务工作者的诊断，治疗和护理行为，使各级医疗机构的医务人员在日常医疗、护理工作中有章可循。《临床诊疗指南》第一版的出版，是我国临床医学发展史上的重要里程碑。

中华医学会人才荟萃，汇集了我国卫生界的医学专家和学术权威。多年来，中华医学会在开展学术交流、引导和推动学术发展、培养医学人才方面发挥了积极而重要的作用。由中华医学会牵头组织的数千名来自全国各地的专家中有老一辈的医学专家，有担当医疗、教学、科研重任的医学骨干，也有近年来崭露头角的后起之秀。他们集中了我国医学界老、中、青医务人员的智慧，汇集了广大临床医学工作者的宝贵经验。专家们的广泛参与和认真讨论，保证了《临床诊疗指南》的代表性和可操作性。《临床诊疗指南》的编写，可谓是一项浩大的工程。借此机会，我代表卫生部对中华医学会、中华口腔医学会、中华护理学会以及各位专家为编写《临床诊疗指南》付出的心血和努力表示衷心的感谢！

《临床诊疗指南》的出版必将极大地推进我国医疗工作科学化、规范化、法制化的进程。卫生部要求我国广大医务工作者在临床实践中认真学习、领会、应用《指南》，为人民群众提供更高质量的临床医疗服务。

《临床诊疗指南》作为洋洋数千万字的医学巨著，第一版的问世难免存在不足之处。希望广大医务人员和医疗卫生管理工作者在医疗服务的实践过程中，及时向中华医学会、中华口腔医学会和中华护理学会反映《指南》中存在的不足。随着医学科学技术的发展，我们将对《指南》不断修订再版，使其日臻完善。



2004年9月

序

在国家卫生部的重视和领导下，中华医学会组织编写的《临床诊疗指南》出版了。这是继《临床技术操作规范》出版后，我国医疗卫生管理界的又一项开创性的出版工程。这部旨在指导全国广大医务工作者临床诊疗行为的巨著的成功出版，是全国军地医疗卫生界数千名专家教授精诚合作的成果。我谨代表全军广大卫生人员，向为本书编写和出版工作付出辛勤劳动的军地医学专家、中华医学会和人民卫生出版社，致以崇高的敬意和衷心的感谢！

出版与《临床技术操作规范》相配套的《临床诊疗指南》，是加强军队医院科学化管理、保证正常医疗秩序、提高医疗工作质量的前提。随着我国社会主义市场经济的迅猛发展，信息技术、生物技术和其他高新技术在各领域的广泛应用，临床诊疗新理论、新技术、新方法不断涌现，医学学科之间、医学学科与人文社会学科之间也广泛相互渗透、影响，形成了一大批引人注目的医学新学科。同时，人口的老龄化、疾病谱的变化、全民卫生保健意识的不断增强，对广大医务工作者的临床诊疗技术和执业能力提出了更高的要求。学习新理论，掌握新技术，不断提高诊治水平，是军地广大医务人员所面临的共同任务，更是提高我国医疗事业整体水平的紧迫需要。

中华医学会组织编写的这部《临床诊疗指南》，全面、系统地介绍了医学科学的最新进展，既有科学可靠的临床诊断标准，又有优化先进的临床治疗方案，充分体现了科学性、先进性、权威性的有机统一，这部巨著的出版，对于加强军队医院科学化管理，保证正常医疗秩序，提高医疗工作质量，确保医疗安全，都具有重要的指导意义。我希望，军队各级医疗机构以及全体医疗工作者，在严格执行《临床技术操作规范》的同时，重视抓好《临床诊疗指南》的学习和使用。以一流的业务技术，一流的医疗质量，一流的服务水平，为广大患者提供更优质的服务，为繁荣我国军地卫生事业，不断做出更大的贡献。

总后卫生部部长 [illegible]

2004 年 10 月

前　言

《临床诊疗指南》是由国家财政部支持、卫生部领导、中华医学会组织编写的指导全国临床医务人员诊断治疗行为的第一部医学学术巨著。

现代临床医疗工作随着信息技术、生物技术和其他高新技术的发展和应用，临床新技术不断涌现，各相关学科的专业分化和交叉更加明显，对疾病的预防、诊断、治疗和转归、康复的认识更加深入，推动着临床医疗事业日新月异的向前发展。尤其是近年发展起来的循证医学采用信息技术，经过大样本的分析研究，在取得充分可靠证据的基础上，提出科学可靠的诊疗方案，实现优化的临床诊断治疗。人类疾病纷繁复杂，病人的病情千变万化，探求疾病预防、诊断、治疗、转归、康复的规律，是对广大医务人员的挑战，更是面临着新的发展机遇。

随着我国社会主义市场经济和社会事业的协调发展，人民生活水平的不断提高，对医疗服务的质量和水平提出了愈来愈高的要求。医务人员必须具备全面的医学理论知识、熟练的医疗技术操作能力、丰富的临床实践经验和良好的医德；要不断更新知识和技术，提高临床诊断治疗水平才能胜任临床医疗工作；要在医疗过程中对每一个病人进行连续、严密的观察，及时准确地做出分析、判断和处理，提供规范化服务。

为了满足广大医务人员学习提高业务水平的需要，对医务人员临床诊断、治疗工作进行具体的指导，使诊疗行为有章可循、有据可依，以有利于提高医务人员的综合素质，提高医疗服务的质量，有利于加强医疗工作的管理，有利于提高人民群众的健康水平，制定符合我国国情的临床诊断治疗指南，成为我国医疗事业发展过程中的一件大事。正是基于这样的考虑，在国家财政部的支持下，卫生部委托中华医学会组织专家编写了《临床诊疗指南》。

自 2001 年开始，《临床诊疗指南》在卫生部的领导下，中华医学会牵头组织了中华口腔医学会和临床专业密切相关的 56 个专科分会，由数千名专家教授历经 4 年编写而成。《临床诊疗指南》内容丰富翔实，具有科学性、权威性、先进性、指导性的鲜明特点，供全国各级医疗机构及其医疗专业人员在临床医疗工作中参照使用。大家在实践中如发现有什么问题或意见和建议，希望能及时反馈给中华医学会，以便再版时进行修订。

《临床诊疗指南》按学科以分册的形式将陆续出版发行。

中华医学会

2004 年 9 月

临床诊疗指南

领导小组名单

组　长　王陇德

副组长　蒋作君　佘　靖　黄洁夫　马晓伟　陈啸宏　李建华
张雁灵　钟南山

成　员（以姓氏笔画为序）

王　羽　王正国　王忠诚　王海燕　王澍寰　巴德年
史轶蘩　白书忠　朱晓东　庄　辉　刘　俊　刘彤华
汤钊猷　祁国明　买买提明·牙生　李兰娟　吴明江
吴孟超　吴咸中　沈倍奋　张震康　张耀华　陆道培
陈可冀　陈洪铎　金连弘　郝希山　胡亚美　顾玉东
高润霖　郭应禄　黄人健　韩济生　韩晓明　戴建平
魏于全

领导小组办公室

主　任　张宗久　韩晓明（兼）

副主任　赵明钢　姜永茂

临床诊疗指南

编辑委员会名单

临床诊疗指南·免疫学分册

编著者名单

主　编　李春海　教授　　军事医学科学院

副主编　王自正　教授　　南京市立第一医院

武建国　教授　　南京军区南京总医院

田亚平　教授　　解放军总医院

编　委（以姓氏笔画为序）

王艾丽　教授　　南京军区南京总医院

朱培元　教授　　南京军区南京总医院

齐　名　教授　　南京军区南京总医院

邹　雄　教授　　山东大学齐鲁医院

陈兴国　博士　　南京市立第一医院

栾建凤　教授　　南京军区南京总医院

虞　伟　教授　　南京军区南京总医院

目　录

第一章　免疫学概论

第一节　免疫学的概念及简史

免疫学是在人类与传染病斗争过程中发展起来的，经验免疫学时期的杰出成就是受中国人种人痘的影响，18 世纪末，Jenner 发明牛痘苗预防天花，免疫由此被正式提出；19 世纪后半期，由于病原菌的发现，抗感染免疫的研究开创了科学免疫学时期；一百余年来，免疫学已发展为一门独立的学科。

一、免疫学的概念

很早以前，人们就注意到传染病患者痊愈后，对该病有不同程度的免疫力。因此，在相当长时期内，免疫是指免除瘟疫，换言之，是指对传染因子的再次感染有抵抗力，这是机体在初次感染后对该传染因子产生了免疫应答的结果。在医学上，免疫（Immunity）是指机体接触抗原性异物的一种生理反应。

免疫的现代定义是：机体针对外源物质的一种反应，其作用是识别和排除抗原性异物，以维持机体的生理平衡。这些维持机体稳定性的反应，通常对机体是有利的，但在某些条件下也可以是有害的。所以，免疫的现代概念可指机体识别和排除抗原性异物的功能，即机体区分自身和异己的功能。

免疫学作为自然科学只有一百年左右的历史。免疫学最初是作为细菌学的一部分，随后作为微生物学的一个分支，它是以研究抗微生物感染而发展起来的。随着研究的深入，人们发现许多免疫现象是与微生物无关的。在 20 世纪 40 年代中期，由于细胞生物学、生物化学和遗传学的发展及渗透，免疫学飞跃发展并成为一门独立的学科。它渗透到许多基础和临床医学领域中，形成了众多的边缘学科如免疫病理学、肿瘤免疫学等。因此，免疫学既是一门渊远流长的古老科学，又是一门富有活力、欣欣向荣、具有巨大发展潜力的新兴学科。

免疫学是研究抗原性异物进入机体后发生的细胞和分子的反应，以及各种免疫现象、理论规律及其相关技术的一门生物科学。

二、免疫系统的基本功能

免疫功能是机体在识别和清除抗原过程中所发挥的各种生物学效应的总和。免疫功能对机体的作用具有双重性：正常情况下，免疫功能维持机体内环境的稳定，具有保护性作用；在异常情况下，免疫功能可能导致某些病理过程的发生和发展。机体免疫系统通过识别“自己”或“非己”抗原并对其产生应答，主要发挥如下三种功能：

（一）免疫防御

免疫防御（immune defence）即抗感染免疫，机体针对外来抗原（如微生物及其毒素）的免疫保护作用。此类功能也可能对机体产生不利影响；若应答过于强烈或持续时间过长，能导致组织损伤和功能异常，即超敏反应；若应答过低或缺如，可发生免疫缺陷病。

（二）免疫自稳

免疫自稳（immune homeostasis）是指免疫系统内存在极为复杂而有效的调节网络，通过清除损伤或衰老的细胞，实现免疫系统功能的相对稳定性。该机制若发生异常，可能使机体对“自己”或“非己”抗原的应答过强或过弱，从而导致自身免疫病的发生。

（三）免疫监视

正常个体的组织细胞可不断发生畸变和突变，机体免疫系统可识别此类细胞并将其清除，此为免疫监视（immune surveillance）。若该功能发生异常，可导致肿瘤的发生或病毒持续感染。

三、免疫学的发展简史

免疫学的发展前后走过经验免疫学时期、传统（经典）免疫学时期、现代免疫学时期。

（一）经验免疫学时期（17～19 世纪）

人们对免疫现象的感性认识时期。

17 世纪中国医学家用人痘苗预防天花，随后人痘苗预防天花传至英国、俄国、朝鲜、日本等国家，为牛痘苗和减毒疫苗的发明提供了宝贵经验。18 世纪末，英国医生 Jenner 发明了牛痘苗预防天花（1798 年），为传染病的预防开创了人工免疫的先河，把接种牛痘称为 Vaccination。

（二）传统免疫学时期（19 世纪中～20 世纪中）

人们对免疫功能的认识，从对免疫现象的观察进入了科学实验时期。这一时期重要成就有：疫苗的发现与应用；抗体的发现与免疫血清疗法；ABO 血

型与免疫化学；细胞转移迟发型超敏反应；免疫耐受现象的发现与证实。

（三）现代免疫学时期（20 世纪中叶至今）

20 世纪前半叶对抗体结构及功能研究非常详尽，免疫化学占主导地位，Burnet 提出的克隆选择学说，为免疫生物学发展奠定了理论基础。1975 年后分子生物学的兴起，从基因水平揭示了 B 细胞、T 细胞抗原识别受体（BCR、TCR）多样性产生的机制，从分子水平阐明信号传导通路，揭示出导致靶细胞发生程序性死亡的信号传导途径。

这一时期重要成就有：Burnet 克隆选择学说；免疫细胞的发现；B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的作用；抗体结构的阐明；单克隆抗体技术的建立；免疫学技术的建立和发展；免疫生物治疗等。

四、免疫学的研究内容

（一）免疫学在基础方面的研究

免疫学的基础研究包括阐明引起免疫应答的抗原、执行免疫应答的免疫系统、免疫应答的现象和机制、免疫应答产物的种类及其特性，以及它们与对应抗原的反应和后果。

（二）免疫学在应用方面的研究

免疫学在应用方面的研究包括建立免疫反应方法、检测抗原以及免疫应答产物等；阐述某些疾病的免疫学发病机制；研究如何促进或阻遏甚至中断不利于机体的免疫过程。进一步通过对免疫系统的结构和功能的研究，理解其对机体有益的防卫功能和有害的病理作用及其机制，进而发展有效的免疫学措施，以实现防病、治病的目的。

五、免疫学在生物学和医学中的作用

（一）免疫学与医学

免疫学的发展及其向医学各学科的渗透，产生了许多免疫学分支学科和交叉学科，如免疫病理学，神经免疫学，临床免疫学，免疫遗传学，肿瘤免疫学，免疫药理学，移植免疫学，免疫毒理学，生殖免疫学等。这些分支学科的研究极大地促进了现代生物学和医学的发展。

免疫学的发展必将在恶性肿瘤的防治、器官移植、传染病的防治、免疫性疾病的防治、生殖的控制，以及延缓衰老等方面推动医学的进步。

（二）免疫学与生物学

免疫系统对“自己”与“非己”的识别，以及对自己成分的免疫耐受和对非己成分的免疫应答，都涉及到细胞间的信息传递、细胞内信号传导和能量转

换等生命过程的基本特性。

免疫系统的功能受遗传控制。目前对机体各种生理功能的遗传控制还知之甚少。免疫遗传学的研究第一次揭开了机体生理功能系统的遗传控制机制。这对在基因水平研究机体的生理功能具有重要意义。

免疫细胞在发育成熟的过程中都伴随有膜表面标志的变化。在发育的任何阶段发生恶性变的免疫细胞，都具有其固有的、特定的膜标志。这些不同分化阶段的恶性肿瘤细胞是研究细胞恶性变机制的理想模型，对研究恶性肿瘤发生学具有重要意义。

免疫细胞及其分子的结构与功能，免疫球蛋白基因表达与调控的研究丰富了分子生物学的研究内容，促进了对真核细胞基因结构和表达调控的认识。免疫学技术的发展，为生命科学的研究提供了有力的手段。单抗的应用给生物科学的发展带来了突破性的变革，免疫组化技术和分子杂交技术的结合，使得对基因及其表达的研究可达到定量、定性、定位的程度。显然，免疫学在生物学的发展中具有重要作用。

（三）免疫学与生物技术的发展

回顾免疫学的发展历史，可以清楚地看到，免疫学每一步重要进展都推动着生物技术的发展。19 世纪末 20 世纪初，免疫学在抗感染方面的巨大成功，促进了生物制品产业的发展。人工主动免疫和被动免疫的应用，有力地控制了多种传染病的传播。在过去 30 年中，免疫学的巨大进展在更深的层次和更广阔的范围内，推动了生物高技术产业的发展。用细胞工程产生的单克隆抗体，用基因工程产生的细胞因子为临床医学提供了一大类具有免疫调节作用的新型药物。这些新型药物主要着重于调节机体的免疫功能，而副作用较少，因而在多种疾病的治疗上具有传统药物所不可替代的作用。目前以免疫细胞因子和单克隆抗体为主要产品的生物高技术产业，已成为具有巨大市场潜力的新兴产业部门。

第二节　免疫组织、器官、细胞及分子

一、免疫组织、器官

免疫系统由免疫器官、组织、免疫细胞及免疫分子等多层次组成。免疫器官可分为中枢免疫器官和外周免疫器官。中枢免疫器官由骨髓及胸腺组成，是免疫细胞发生、分化、发育和成熟的场所。骨髓是各种血细胞（包括免疫细胞）的来源，也是 B 细胞发育、分化、成熟的场所。胸腺是 T 细胞分化、发

育、成熟的场所，胸腺微环境对 T 细胞的发育起着重要作用。外周免疫器官包括淋巴结、脾和黏膜免疫系统等，是成熟 T 细胞、B 细胞定居的场所，也是免疫应答的部位。淋巴结和脾可清除进入体内的病原体。黏膜免疫系统包括肠、鼻和支气管相关淋巴组织，这些部位有产生 sIgA 的 B 细胞，它们在肠道、呼吸道及泌尿生殖道等黏膜部位发挥抗感染作用。

二、免 疫 细 胞

（一）天然免疫细胞

吞噬细胞是机体抗感染免疫的主要效应细胞，可吞噬杀伤病原体；还可通过分泌细胞因子和炎性介质，发挥免疫调节、介导炎症反应的作用。抗原递呈细胞能诱导 T 细胞活化，启动获得性免疫应答；还可通过分泌细胞因子发挥免疫调节作用。NK 细胞是执行免疫监视作用的效应细胞，对肿瘤和病毒感染的靶细胞产生细胞毒作用；亦可通过分泌 IFN-γ 和 LT-α 等细胞因子产生免疫调节作用。NKT 细胞是表面具有 NK1.1 分子和 TCR-CD3 复合受体分子的 T 细胞，主要分布在骨髓、肝和胸腺。可通过识别靶细胞 CD1 分子递呈的脂类和糖脂类抗原，对胞内寄生的微生物和肿瘤靶细胞发挥细胞毒作用，也可分泌细胞因子参与免疫调节。

（二）T 淋巴细胞

按细胞表面标志 TCR 不同，T 细胞可分为 αβT 细胞和 γδT 细胞；按功能不同将 αβT 细胞又分为辅助性 T 细胞和杀伤性 T 细胞；其他还有 Tγ 细胞和 NKT 细胞。T 淋巴细胞表面具有多种膜分子，TCR-CD3 复合分子为 T 细胞的特有标志，TCR 接受抗原信号，由 CD3 分子将信号向细胞内转导。CD4 与 CD8 分子作为共刺激分子参与 T 细胞与抗原递呈细胞的信号传导。

分泌 IL-2、IFN-γ、LT-α 等细胞因子的 T 细胞称为 Th1 细胞，介导细胞免疫应答，参与迟发型超敏反应和器官特异性自身免疫性疾病。而将分泌 IL-4、IL-5、IL-6 及 IL-10 等细胞因子的 T 细胞称为 Th2 细胞，辅助体液免疫应答，并在过敏性疾病和感染性疾病中发挥作用。$CD8^+$ T 细胞可通过分泌穿孔素、粒酶、淋巴毒素及表达凋亡分子等引起靶细胞的裂解和凋亡。Tγ 细胞通过抑制性调节 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的活化与增殖，抑制免疫应答。NKT 细胞在自身免疫、寄生虫感染和肿瘤生长中发挥作用。

（三）B 淋巴细胞

B 细胞表面有多种标志，它们在 B 细胞分化和功能执行中发挥重要的作用。B 细胞按有无 CD5 分子的表达，可分成 B-1 细胞和 B-2 细胞；B-2 细胞又可分成两个亚群。不同亚群 B 细胞定位于机体不同的淋巴组织部位。B 细胞是

产生抗体、递呈抗原以及参与免疫调节的免疫细胞。

三、免 疫 分 子

（一）抗原

抗原（antigen，Ag）是指能与 T、B 淋巴细胞的 TCR 或 BCR 结合，促使其增殖、分化、产生抗体或致敏淋巴细胞，并与之结合，进而发挥免疫效应的物质。抗原的免疫原性是异物性，其特异性是指抗原刺激机体产生免疫应答及其与应答产物发生反应所显示的专一性，其结构基础是存在于抗原分子中的抗原表位，抗原表位是抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团，可分为线性表位和空间构象表位，或称为 T 细胞表位和 B 细胞抗原表位。

抗原免疫应答的类型及强度取决于抗原物质本身的性质及其与机体的相互关系。抗原本身的性质包括抗原的化学性质、相对分子质量大小、结构的复杂性、分子构象等；机体方面包括遗传因素、年龄、性别和健康状态影响了抗原的免疫效果；接种抗原的剂量、途径、次数以及免疫佐剂的选择也影响机体对抗原的应答。

根据诱生抗体时是否需要 Th 细胞参与而分为胸腺依赖性抗原（TD-Ag）和胸腺非依赖性抗原（TI-Ag）。它们在抗原表位的组成、免疫应答的类型和免疫记忆的形成等方面都有差别。按遗传亲缘关系的远近，也可分为异嗜性抗原、异种抗原、同种异型抗原、自身抗原和独特型抗原。另外超抗原可通过直接与 TCR Vβ 链结合，激活某些亚型的 T 细胞克隆；佐剂则通过与抗原同时注入体内，增强机体对该抗原的免疫应答；丝裂原可与淋巴细胞表面相应受体结合，刺激有丝分裂，激活淋巴细胞。

（二）抗体

抗体（antibody，Ab）是由 B 细胞受抗原刺激后增殖分化为浆细胞后所产生的免疫球蛋白（Ig）。免疫球蛋白由两条重链和两条轻链经二硫键连接形成的 Y 字形结构。重链包括 αβγδε 五种链，分别命名为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE 五类；轻链有两种链即 κ 链和 λ 链，抗体有可变区、恒定区和铰链区，可变区的高变区组成免疫球蛋白的抗原结合部位，决定着抗体的特异性，识别及结合抗原；另一端恒定区则具有激活补体、结合 Fc 受体和穿过胎盘和黏膜的功能。免疫球蛋白有多种亚类和亚型。外源抗原多样性的存在是导致免疫球蛋白异质性的外源因素，免疫球蛋白分子内部不同抗原表位的存在是抗体血清型的物质基础，有同种型、同种异型和独特型。

免疫球蛋白的可变区识别并特异性结合抗原，而恒定区则通过激活补体、结合 Fc 受体和穿过胎盘发挥作用。IgG 是机体抗感染的主要抗体，在血清和

细胞外液中含量最高，是再次免疫应答产生的主要抗体，其亲和力高，分布广泛，可穿过胎盘屏障；IgM 是机体抗感染的最先出现的抗体，是最早合成和分泌的抗体；IgA 有血清型和分泌型，sIgA 是外分泌液中的主要抗体，参与黏膜局部免疫；血清型 IgD 半寿期短，膜结合型是 B 细胞分化发育成熟的标志；IgE 是正常人血清中含量最少的抗体，为亲细胞抗体，与Ⅰ型超敏反应和机体抗寄生虫免疫有关。

（三）补体

补体系统包括三十余种成分，是体内一个重要的免疫效应系统。补体在不同激活物质作用下可经经典途径、MBL 途径或旁路途径被活化，然后通过末端共同的通路，形成膜攻击复合物，参与机体免疫效应。补体活化过程中还产生多种活性片段，可参与调节特异性免疫应答，并发挥广泛的生物学作用。补体活化处于机体调控之中，体内多种成分参与对补体激活的调节，如有缺陷，可导致补体功能的紊乱。

（四）细胞因子

细胞因子是由机体的各种细胞分泌的可溶性蛋白，通过旁分泌、自分泌、内分泌的方式发挥作用。细胞因子在机体内相互促进或相互抑制，形成复杂的细胞因子调节网络。细胞因子可分为四类：造血因子家族、干扰素家族、肿瘤坏死因子家族、趋化性细胞因子家族。细胞因子参与天然免疫、特异性免疫和造血细胞的生长分化。一些细胞因子的受体存在天然拮抗剂，由此开发的重组细胞因子、细胞因子抗体和细胞因子受体拮抗蛋白已获得了广泛的临床应用，发挥了重要的生物治疗作用。

（五）白细胞分化抗原

白细胞分化抗原、黏附分子、趋化蛋白等是重要的免疫细胞表面功能分子。CD 分子的新的种类和功能在不断被发现和阐明过程中，黏附分子根据其结构特征可分为整合素家族、IgSF、钙黏素家族等，广泛参与免疫应答、炎症发生、淋巴细胞归巢等生理和病理过程。CD 和黏附分子及其单克隆抗体在基础医学和临床医学中的应用十分广泛。

（六）HLA

人体主要组织兼容性复合体 HLA 定位于第 6 号染色体短臂 6p21.31 区，全长 3 600kb，224 个基因，其中 128 个为功能基因，39.8%和免疫功能相关，它由经典的 HLA 基因和免疫功能相关基因两大类组成。前者包括 HLA Ⅰ类、Ⅱ类基因，其产物的结构、组织分布和功能行使各有特点，在获得性免疫应答中发挥重要作用；后者主要包括血清补体成分编码基因、抗原加工递呈相关基因、非经典Ⅰ类基因和炎症相关基因，较多地参与调节天然免疫应答。

HLA 基因具有丰富的多态性，等位基因总数在 1 000 个以上，是导致个体间免疫应答能力和对疾病易感性出现差异的主要免疫遗传学原因。确定不同个体所拥有的等位基因及其产物的特异性称为 HLA 分型。

HLA 和医学紧密相联，HLA 分型为器官移植前的供受对选择和开展亲子鉴定提供了有效的手段。HLA 和自身免疫病存在不同程度的关联，进一步的研究有利于阐明这些疾病的发病机制。

第三节 免疫应答

天然免疫应答是机体在种系发育和进化过程中形成的免疫防御功能。其特点是：作用范围广，不针对特定抗原，先天获得，出生后即具备。而获得性免疫是出生后通过与抗原物质接触后所产生的一系列防御功能，有特异性、多样性和记忆性的特点。

一、天然免疫应答

参与天然免疫的防御屏障有：基本屏障由物理屏障和解剖学屏障组成；生理屏障主要有温度、胃酸、可溶性蛋白、溶菌酶、干扰素、补体等组成；吞噬屏障主要由吞噬细胞执行；炎症屏障由吞噬细胞释放的细胞因子完成。另外补体的 MBL 途径和替代途径也属于天然免疫范围，其他免疫细胞有 NK 细胞、NKT 细胞、γδT 细胞。天然免疫分子有补体、细胞因子和黏附分子等。天然免疫应答是在天然免疫细胞和分子协同作用下完成的。天然免疫细胞可识别受体直接识别结合病原体而被激活，迅速产生免疫作用，在免疫应答过程中，不能形成免疫记忆。天然免疫应答启动获得性免疫应答，可影响免疫应答的类型，并协助获得性免疫应答发挥免疫效应。

二、获得性免疫应答

（一）抗原的加工递呈

获得性免疫应答过程中，首先需要对抗原进行加工处理和递呈，体内具有该功能的细胞主要是吞噬细胞（Mφ）、树突状细胞（DC）和 B 细胞。吞噬细胞主要在处理来源于细菌等感染性微生物的抗原中发挥了重要作用。树突状细胞是机体内功能最强和最重要的抗原递呈细胞（APC），是机体免疫反应的启动者，能够促进 T 细胞增殖，而 B 细胞通过抗原受体特异性摄取可溶性抗原。外源性抗原被摄取后主要通过 MHCⅡ类途径加工处理和递呈，内源性抗原主要通过 MHCⅠ类途径加工处理和递呈。

（二）T 淋巴细胞对抗原的识别及免疫应答

T 细胞的激活首先通过 TCR 识别抗原递呈细胞递呈的抗原肽-MHC 复合物，在协同刺激分子提供的第二活化信号的协同作用下，T 细胞进一步得到有效的活化，活化信号传至细胞内，首先活化 PTK，继尔启动胞内级联的信号传导反应，涉及很多胞内分子事件，如 ITAM 的磷酸化、活化 ZAP-70、活化 PLC-γ 及 Ras，产生 IPS 和 DAG、MAP 激酶级联反应等构成活化信号传导途径，再活化转录因子而结合到靶基因的启动子区，促使原癌基因、细胞因子及其受体基因表达。通过细胞因子的作用，促使特异性 T 细胞克隆扩增，分化为有不同功能特性的效应细胞。

（三）B 淋巴细胞对抗原的识别及免疫应答

B 淋巴细胞活化的信号传导途径类似于 T 细胞，PTKSrc 和 PTKSyk 激酶的活化起关键作用。信号经磷脂酰肌醇途径、MAP 激酶途径和 PI-3 激酶途径引起各种转录因子激活，并活化有关基因，使 B 细胞从 G_0 期到 G_1 期。

TI 抗原对 B 细胞的活化，可通过抗原分子直接与 BCR 交联，或通过 LPS 受体及 CD21 补体受体起作用。吞噬细胞分泌的细胞因子可辅助 B 细胞活化和增殖。TD 抗原引起 B 细胞活化的第一信号由 BCR-Igα/Igβ 复合物和辅助受体 CD21-CD19-CD81 等共同提供，第二信号来自于 CD40-CD40L 以及 Th2 分泌的 IL-4。

蛋白质抗原诱发的二次免疫应答形成生发中心，促成 B 细胞增殖、V 区基因突变、抗体亲和力成熟、类别转换及记忆 B 细胞生成。细胞因子参与 B 细胞的增殖活化和抗体类别转换。

三、免 疫 调 节

免疫调节是机体为了维护自身内环境稳定，在进化过程中形成的制约免疫应答质和量的机制，它存在免疫应答的不同阶段和不同水平。抗原的剂量、性质、引入方式以及和 MHC 分子的亲和力都会影响免疫应答的性质。Th1 和 Th2 的调节在免疫应答中起重要作用，它们的分化受抗原递呈细胞、T、B 细胞的调节。

免疫细胞表达两类功能相反的受体，该分子的胞内段分别带有激活基序和抑制基序，T、B、NK 和肥大细胞各自以相应的抑制性受体阻断激活信号的传导，调节免疫细胞的激活和功能。凋亡也参与了免疫应答的反馈机制。独特型网络在免疫应答中起着非常重要的调节和平衡作用，抗原内影像具有潜在的应用价值。神经、内分泌和免疫系统三者之间有着广泛的联系，其物质基础是神经递质、激素、细胞因子以及相应的受体。

第四节 临床免疫病理

一、超敏反应

根据发生机制将超敏反应分为四种类型：Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型超敏反应主要由体液免疫，即由抗体介导的。

Ⅰ型超敏反应主要由 IgE 类抗体介导，可通过患者血清被动转移，起主要作用的细胞有肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。Ⅱ型超敏反应主要由 IgG 或 IgM 类抗体介导，补体、吞噬细胞和 NK 细胞参与，引起细胞溶解和组织损伤。Ⅲ型超敏反应主要由 IgG 类抗体介导，补体和血小板、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞参与，引起充血水肿、中性粒细胞浸润致血管炎性反应和组织损伤。Ⅳ型超敏反应是细胞免疫介导，即由 T 细胞介导的以单核-吞噬细胞和淋巴细胞为主，引起炎症反应和组织损伤。

非特异性免疫细胞和分子（粒细胞、单核-吞噬细胞、NK 细胞、淋巴细胞、血小板、肥大细胞及补体成分等）参与各型超敏反应的炎症性损伤，但所起作用的大小不尽相同。同一种抗原物质，如青霉素可引起Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ型超敏反应。同一疾病，如链球菌感染后肾小球肾炎和系统性红斑狼疮（SLE）均可通过Ⅱ、Ⅲ型超敏反应引起。

二、自身免疫

自身免疫是机体免疫系统对自身成分发生免疫应答的现象。自身免疫性疾病是机体对自身成分发生免疫应答而导致的疾病。自身抗体和自身反应性 T 淋巴细胞介导的对自身成分发生的获得性免疫应答是自身免疫性疾病发生的原因。自身抗体可引起自身细胞破坏、细胞表面受体的功能改变和形成免疫复合物等方式引起自身免疫性疾病。

自身免疫性疾病的发生往往是自身抗体和自身反应性 T 淋巴细胞共同作用的结果。自身抗原的释放、改变、微生物感染、表位扩展、免疫耐受的失衡都可引起自身免疫性疾病的发生，也和遗传和性别等因素有关。

自身免疫性疾病可分为器官特异性和非器官特异性自身免疫性疾病。器官特异性自身免疫性疾病患者的病变局限于某一特定的器官，由对器官特异性抗原的免疫应答引起。非器官特异性自身免疫性疾病，可累及多种器官和组织。

三、免疫缺陷

原发性免疫缺陷病大多由基因突变而引起，其中大部分基因产物的功能涉及特异性免疫应答的各个方面，包括抗原加工和递呈、T 和 B 细胞受体的重排、TCR 复合物的组成、抗原受体介导的信号传导、细胞因子及其受体的组成等；另一部分基因的产物涉及由吞噬细胞和补体参与的非特异性免疫防御。原发性免疫缺陷病由于免疫细胞起源于骨髓干细胞，基因疗法有广阔的前景。

获得性免疫缺陷病继发于其他疾病或免疫系统的医源性抑制。由 HIV 感染引起的免疫缺陷病是典型的获得性免疫缺陷病。HIV 主要侵犯宿主 $CD4^+$ T 细胞以及表达 CD4 分子的单核-吞噬细胞、树突状细胞和神经胶质细胞等。HIV 感染后，$CD4^+$ T 细胞数目不断减少，淋巴组织结构逐渐破坏，最终导致严重的细胞免疫和体液免疫缺陷。

四、感染免疫

感染免疫是机体免疫系统识别和清除病原体的一系列生理性防御机制，当病原体侵入机体，在形成感染过程的同时，免疫系统就产生一系列防御应答，其结局可以是：感染不形成；感染形成但逐渐消退；感染扩散，患者死亡。

感染免疫包括天然免疫和获得性免疫，入侵病原体如数量毒力不高，天然免疫就能消灭，不引起感染。如毒力强，需待特异性产生，再两者协同配合，将毒性病原体清除。一般情况下，感染免疫对机体是有益的，但有时也会造成机体损伤。

五、肿瘤免疫

肿瘤细胞表达抗原是诱发有效肿瘤免疫应答的关键，肿瘤抗原需要由 MHC 分子递呈，并被 T 细胞所识别，机体通过肿瘤抗原特异激活 CTL 直接杀伤肿瘤细胞，或激活 B 细胞产生抗体。机体抗肿瘤以细胞免疫应答为主，依赖于激活的 T 细胞、NK 细胞、吞噬细胞对靶细胞直接杀伤并释放效应分子，同时也涉及抗体、补体、细胞因子和黏附分子等多种免疫成分。肿瘤抗原的寻找、鉴定及其性质分析是肿瘤免疫学研究的核心内容，目前已在多种动物和人类肿瘤细胞中发现了肿瘤特异性抗原。尽管肿瘤细胞具有抗原性，但肿瘤细胞免疫源性低下，肿瘤细胞可通过其本身抗原调变、MHC Ⅰ类分子表达减少、分泌免疫抑制性物质等，并利用宿主免疫系统存在的缺陷，可以逃避免疫系统的攻击，因此肿瘤的免疫研究仍然任重而道远。

六、移 植 免 疫

移植免疫是指通过移植器官，代替丧失功能的器官，并确保移植后移植物存活而避免排斥的科学。包括自体移植、同种同基因移植、同种异基因移植和异种移植四种，移植排斥反应可分为宿主抗移植物反应和移植物抗宿主反应。通过 HLA 检测及组织配型选择移植物，采用免疫学手段监测排斥反应，应用免疫抑制药物控制排斥反应，确保移植物长期存活是移植免疫学研究的主要任务。

第二章　免疫学常用检验技术与质量控制

第一节　免疫比浊测定法

免疫比浊测定法（immunoturbidimetry）是将现代光学测量仪器与自动分析检测系统相结合应用于沉淀反应，可对微量的抗原、抗体及其他生物活性物质进行定量测定，近年来发展很快，已建立数种不同类型的测定方法。

［概述］

免疫比浊测定法按照仪器设计的不同可以分为两种，即比浊仪测定（turbidimeter measure）和散射比浊仪测定（nephelomiter measure）。比浊仪测定是测量由于反射、吸收或散射引起的入射光衰减，其读数以吸光度 A 表示。A 值反映了入射光与透射光的比率（$A=2-\log 10^{T}$，T 代表浊度百分比）。散射比浊仪测定是测量入射光遇到质点（复合物）后呈一定角度散射的光量，该散射光经放大后以散射值表示，两者比较见图 2-1。

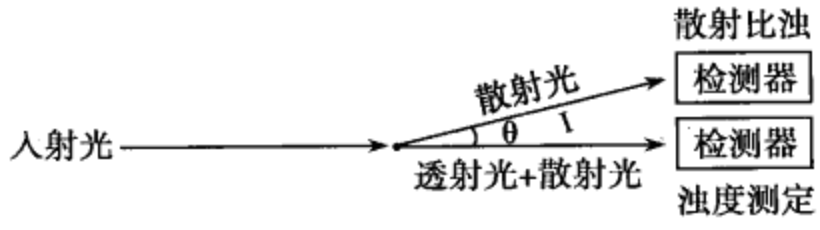


图 2-1　透射光和散射光测定比较

由于免疫复合物的形成有时限变化，当抗原抗体相遇后立即结合成小复合物（≤19 秒），几分钟到几小时才形成可见的复合物（>19 秒）。作为快速比浊测定，这种速度太慢，加入聚合剂（或促聚剂）可加速大的免疫复合物分子的形成。目前促聚剂多采用聚乙二醇（MW6 000～8 000），浓度约为 40g/L。因此免疫比浊测定的原理是：抗原抗体在特殊缓冲液中快速形成抗原抗体复合物，使反应液出现浊度。当反应液中保持抗体过量时，形成的复合物随抗原量增加而增加，反应液的浊度亦随之增加，与一系列的标准品对照，即可计算出

受检物的含量。

［原理与实验方法］

1. 透射免疫比浊法（transmission immunoturbidimetry） 当光线通过一个浑浊介质溶液时，由于溶液中存在混浊颗粒，光线被吸收一部分，吸收的多少与混浊颗粒的量成正比，这种测定光吸收量的方法称为透射比浊法。用于血浆蛋白与其抗体结合后形成的复合物对抗原定量的透射比浊法，称为透射免疫比浊法。此法要求：

（1）单价特异抗体。

（2）抗原抗体比例适当，通常要求抗体过量，此时随抗原量的增加抗原抗体复合物形成也增加。

（3）溶液中有非离子性亲水多聚体促进免疫复合物的形成，如聚乙二醇6 000等，溶液 pH 为 6.5～8.0 之间为宜。

在上述条件下，当一定波长的光线通过反应混合液时，被其中抗原抗体反应形成的免疫复合物（IC）吸收而减弱。在一定范围内，透射光被吸收的量（吸光度）与 IC 量呈正相关，而 IC 的量则与相应抗原和抗体的量呈函数关系。因此当抗体量固定时，根据 IC 的吸光度值，即可推算出待测抗原含量。此法目前主要用于生化自动分析仪测定。

2. 散射免疫比浊测定法（immunonephelometry） 此法的原理是可溶性抗原、抗体在液相中特异性地结合，产生一定大小的复合物（IC），当一定波长的光通过该溶液遇到 IC 时，光线被散射并发生偏转，散射光的强度与 IC 的含量和散射夹角成正比，与光波长成反比。当散射夹角和入射光波长一定时，散射光的强度与 IC 的量成正比，而当反应液保持抗体过剩时，形成的 IC 量又与抗原成正比。因此，通过检测散射光强度可以推算出待测抗原的含量。此法目前主要用于免疫球蛋白、补体成分和细胞因子等的测定。测定方法有以下 3 种。

（1）速率法：IC 形成的速度在每个单位时间内是不相同的，进行动力学测定，可以发现在某一时间反应最快，IC 形成量最多，透射或散射光的强度随之最大，即所谓速率峰。最大反应速率（峰值）与抗原量呈正相关。

（2）定时法：在抗原-抗体反应过程中，于前后 2 个不同的时间（如抗原抗体刚开始反应后的 10 秒钟和开始反应后的 6 分钟）进行测定，两测量值之差与抗原量成正比。

（3）终点法：在抗原-抗体反应达到平衡即 IC 形成终点（一般为 15～30 分钟）时进行测定。

3. 胶乳免疫比浊测定法（immunolatex turbidimetry） 原理是：将抗体吸

附在大小适中、均匀一致的胶乳颗粒（一般为 0.2μm）上，当遇到相应抗原时，胶乳颗粒发生凝集。单个胶乳颗粒在入射光波之内不阻碍光线透过，两个或两个以上胶乳颗粒凝聚时则使透过光减少，减少的程度与胶乳颗粒凝聚的程度呈正比，也与待测抗原量呈正比。根据标准曲线即可得知待测标本中抗原含量。

4. 速率抑制免疫比浊法（rate inhibition immunoturbidimetry）　此法用于测定半抗原和药物等小分子物质。方法是用化学交联剂使半抗原与载体耦联，将其免疫动物制备抗血清。然后将一定量的半抗原—载体（大分子）与限量的抗体发生反应，形成的免疫复合物可产生一定的速率散射峰值。当反应系统内加入待测标本时，其中所含的半抗原（小分子）竞争与抗体结合，使大分子的半抗原载体—抗体—复合物的形成受到抑制，从而使速率散射峰值降低。根据标准曲线即可计算出标本中待测半抗原（或药物）的含量。

第二节　凝集反应

颗粒性抗原如细菌、细胞与黏附有抗原的胶乳颗粒在与特异性抗体反应时，抗体在相邻颗粒上的表位之间形成桥联，从而引起肉眼可见的凝集现象。

［概述］

早在 1896 年，Widal 就利用伤寒病人血清与伤寒杆菌发生特异性凝集的现象成功地诊断伤寒病。1900 年 Landsteiner 在特异血凝现象的基础上发现了人类 ABO 血型，于 1930 年获得诺贝尔生理学和医学奖。一个世纪以来，这些经典的血清学方法一直沿用至今，并继续造福于人类。目前已发展建立了各种间接凝集实验、间接凝集抑制实验、Coombs 实验及固相免疫吸附血凝实验等不同的方法（见图 2-2）。

- 凝集反应
  - 直接凝集反应
    - 玻片法
    - 试管法
  - 间接凝集反应
    - 正向间接凝集试验
    - 反向间接凝集试验
    - 间接凝集抑制试验
    - 协同凝集试验
  - Coombs 试验
    - 直接法
    - 间接法
  - 固相免疫吸附血凝试验

图 2-2　凝集反应的类型

[原理与实验方法]

1. 直接凝集反应　直接凝集反应是将细菌、螺旋体或红细胞等颗粒性抗原与相应的特异性抗体混合，经过一定的反应时间后出现的凝集现象。实验中的抗原称为凝集原，抗体称为凝集素。常用的实验方法有玻片法和试管法两种。

（1）玻片凝集实验：本法为定性实验。一般是用已知的抗体作为诊断试剂，滴加于洁净的载玻片或凹玻片孔内，加入待检细菌或红细胞悬液混合均匀，同时作生理盐水或正常血清对照。放置室温内数分钟后即可观察实验结果，出现颗粒状凝集者为阳性反应，如血型鉴定。也可用已知抗原为诊断试剂，测定待测血清中的特异抗体，如检测梅毒患者非密螺旋体抗体实验。

（2）试管凝集实验：本法为半定量实验。常用已知的抗原作为诊断试剂，与一系列稀释的待检血清在小试管内混合，37℃温育一定时间后观察实验结果。同时以生理盐水加抗原作为对照，应无非特异性自凝现象。以出现明显的颗粒状或絮片状凝集现象的待检血清最高稀释倍数的倒数作为抗体的效价（或滴度），例如肥达（Widal）实验。该实验亦可改用微量滴定板法，可以减少相应抗原和抗体的试剂用量。

2. 间接凝集反应　是将可溶性抗原（或抗体）吸附在一种与免疫无关的惰性载体颗粒表面，使其成为致敏载体，然后与相应抗体（或抗原）结合，在电解质存在的条件下，载体颗粒被动地发生凝集，因此称为间接凝集反应或被动凝集反应。用于吸附抗原（或抗体）的载体颗粒主要有红细胞（如绵羊红细胞或正常人“O”型红细胞）、聚苯乙烯胶乳微粒、活性炭粒等。根据实验时所用致敏载体颗粒不同分别称为间接（或被动）血凝实验，胶乳凝集实验，炭粒凝集实验等。间接凝集反应的灵敏度比直接凝集反应高 2～8 倍。根据载体致敏时所用试剂及反应方式，间接凝集反应有以下几种方法。

（1）正向间接凝集实验：以可溶性抗原致敏载体颗粒，用于检测标本中的相应抗体。例如用新鲜或醛化的绵羊红细胞（SRBC）或正常人“O”型红细胞作为吸附抗原的载体。用微量血凝板测定法，将待测血清在血凝板反应孔内连续倍比稀释后加入致敏红细胞，结果以红细胞在反应孔孔底出现凝集为阳性。通常以 2＋（50％凝集）为判定终点。出现凝集的血清最高稀释倍数的倒数为待测血清中特异抗体的效价。

（2）反向间接凝集实验：以特异性抗体致敏载体颗粒，用于检测标本中的相应抗原。其他与正向间接凝集实验基本相同。

（3）间接凝集抑制实验：此法是由间接凝集实验衍生的一种实验方法。其

原理是将待测抗原（或抗体）与特异性抗体（或抗原）先行混合，作用一定时间后，再加入相应的致敏载体悬液。如待测抗原与抗体对应，即发生中和，随后加入的相应致敏载体颗粒不再被凝集，即原来本应出现的凝集现象受到抑制，故而得名。此实验的灵敏度高于正向或反向间接凝集实验。

（4）协同凝集实验（coagglutination，CoA）：CoA 实验的原理与反向间接凝集实验类似，但所用载体和致敏方法不同。CoA 系利用金黄色葡萄球菌（以下简称金葡菌）菌体细胞壁中所含的 A 蛋白（SPA）能与特异性抗体 IgG 的 Fc 段结合，成为吸附特异性抗体的载体。与相应的抗原（细菌、病毒、毒素等）接触时，通过菌体表面抗体的 F（ab′）$_2$ 片段与抗原特异结合，从而使金葡菌发生肉眼可见的凝集。此法曾用于伤寒沙门菌的快速鉴定。

3. Coombs 实验　此实验是 1945 年由 Coombs 建立的一种抗球蛋白抗体参与的血凝实验，用于检测抗红细胞的不完全抗体。该抗体多半是 7S 的 IgG 分子，因其体积小，长度短（2.5×10^3nm，而 19S 的 IgM 长度为 9.5×10^3nm），它只能与一方红细胞抗原的决定簇结合，而不能同时与双方红细胞的抗原决定簇连接，因此不能发生凝集反应。此时，如在待测试的抗原和抗体（不完全抗体）之外，再加入抗该种 IgG 球蛋白的抗体，即可出现凝集现象。实验方法分为直接 Coombs 实验和间接 Coombs 实验两种。

（1）直接 Coombs 实验：用于检查已吸附在红细胞上的不完全抗体。该法是将病人红细胞用生理盐水洗涤 3 次后，配成 5%悬液，然后加等量不同稀释度的抗人球蛋白抗体混合，如出现凝集，即表明病人红细胞上已吸附有不完全抗体。

（2）间接 Coombs 实验：该法用于检查血清中游离的不完全抗体。方法是将受检者血清与具有相应抗原特异性的红细胞悬液混合温育并洗涤后，配成 5%悬液。然后加等量抗人球蛋白抗体混合，观察结果。如出现凝集，即证明受检者血清中含有游离的不完全抗体。

4. 固相免疫吸附血凝实验（SPISHA）　SPISHA 是将血凝实验与固相免疫吸附技术相结合，其原理与酶联免疫吸附实验（ELISA）相似。但用抗原（或抗体）致敏的红细胞作为指示系统。例如，将抗体（或抗原）包被于聚苯乙烯反应板微孔，加入待测血清，血清中抗原（或抗体）即可与固相抗体（或抗原）结合，洗去未反应物后加入用特异抗体（或抗原致敏的红细胞，孔壁上即形成一层凝集的红细胞。此法曾用于乙肝病毒 HBsAg 的测定。

第三节 放射免疫分析与免疫放射分析

[概述]

20 世纪 60 年代初，Yalow 和 Berson 创立以放射性同位素作为示踪物的标记免疫测定方法以来，已先后建立了放射免疫分析、放射受体分析和免疫放射分析等微量测定技术，在医学和其他生物学科的研究领域和临床实验诊断中广泛开展，用于各种微量蛋白质、激素、小分子药物及肿瘤标志物等的分析与定量测定。

一、放射免疫分析技术

[原理]

放射免疫分析技术（radioimmunoassay，RIA）一般采用竞争结合分析技术。其原理为放射性标记抗原（Ag^*）和被测抗原（或标准品）对有限的特异性抗体发生可逆性的竞争结合反应，最终形成的放射性抗原-抗体复合物的量与被测物的含量呈负相关。当抗体的量固定不变时，免疫复合物的形成就受到待测抗原含量的制约。如反应系统中待测抗原（Ag）含量高时，对抗体（Ab）的竞争结合能力就强，Ag-Ab 复合物的形成量就会增加，Ag^*-Ab 复合物则相对减少；反之，当待测 Ag 含量低时，对 Ab 的竞争结合能力弱，Ag^*-Ab复合物的形成量即增多。

在 RIA 反应中，标记抗原与抗体结合后，必须分离结合抗原和游离的放射性标记物（方法主要有第二抗体沉淀法、聚乙二醇沉淀法等），然后分别对游离部分（F）和结合部分（B）的放射性进行测定，其结合率 B/(B+F) 与标本中的抗原量呈函数关系。因此通过绘制条剂量反应曲线，即可得出待测样本中抗原的含量。

[试剂]

1. 标准品　是竞争放射免疫分析的定量依据，标准品应尽量与待测抗原的化学结构完全相同。在某些特殊情况下，也可用结构相似，与抗体亲和力相近的物质代替，但必须列出其换算系数。

2. 多克隆或单克隆抗体。

3. 放射性标记物。

4. 分离剂　用于将结合和游离的部分分离。

5. γ 计数仪。

［实验方法］

1. 抗原抗体反应　将抗原（标准品和受检标本）、标记抗原和抗血清按顺序定量加入小试管中，在一定的温度下反应一定时间，使竞争抑制反应达到平衡。不同质量的抗体和不同含量的抗原对温育的温度和时间有不同的要求。如受检标本抗原含量较高，抗血清的亲和常数较大，可选择较高的温度（15～37℃）进行较短时间的温育，反之应在低温（4℃）作较长时间的温育，形成的抗原-抗体复合物较为牢固。

2. 结合态与游离态标记抗原的分离技术　在 RIA 反应中，标记抗原和特异性抗体的含量极微，形成的标记抗原抗体复合物（B）不能自行沉淀，因此需用一种合适的沉淀剂使它彻底沉淀，以完成与游离标记抗原（F）的分离。另外对小分子量的抗原也可采取吸附法使 B 与 F 分离。

（1）第二抗体沉淀法：这是 RIA 中最常用的一种沉淀方法。将产生特异性抗体（第一抗体）的动物（例如兔）的 IgG 免疫另一种动物（例如羊），制得羊抗兔 IgG 血清（第二抗体）。由于在本反应系统中采用第一、第二两种抗体，故称为双抗体法。在抗原与特异性抗体反应后加入第二抗体，形成由抗原-第一抗体-第二抗体组成的双抗体复合物。但因第一抗体浓度甚低，其复合物亦极少，无法进行离心分离，为此在分离时加入一定量的与一抗同种动物的血清或 IgG，使之与第二抗体形成可见的沉淀物，与上述抗原的双抗体复合物形成共沉淀。经离心即可使含有结合态抗原（B）的沉淀物沉淀，与上清液中的游离标记抗原（F）分离。

将第二抗体结合在颗粒状的固相载体之上即成为固相第二抗体。利用固相第二抗体分离 B、F，操作简便、快速。

（2）聚乙二醇（PEG）沉淀法：PEG 沉淀剂的主要优点是制备方便，沉淀完全。缺点是非特异性结合率比第二抗体法高，且温度高于 30℃时沉淀物容易复溶。

（3）PR 试剂法：是一种将第二抗体与 PEG 相结合的方法。此法保持了两者的优点，节省了两者的用量，而且分离快速、简便。

3. 放射性强度的测定　结合态与游离态标记抗原分离后，即可进行放射性强度测定。测量仪器有两类，液体闪烁计数仪（测 ^{3}H、^{14}C 等）和晶体闪烁计数仪（测 ^{125}I、^{51}Cr 等）。

计数单位是探测器输出的电脉冲数，单位为 cpm（计数/分），也可用 cps（计数/秒）表示。如果知道这个测量系统的效率，还可算出放射源的强度，即 dpm（衰变/分）或 dps（衰变/秒）。

每次测定均需作标准曲线图，以标准抗原的不同浓度为横坐标，以在测定

中得到的相应放射性强度为纵坐标作图。放射性强度可任选 B 或 F，亦可用计算值 B/(B+F)、B/F 和 B/B_0。标本应作双份测定，取其平均值，在制作的标准曲线图上查出相应的受检抗原浓度。

二、免疫放射分析技术

[原理]

免疫放射分析技术（immunoradiometric assay，IRMA）是将放射性同位素标记在抗体上，然后以过量的标记抗体与待测抗原结合，未结合的标记抗体通过和固相的抗原免疫吸附剂结合而去除，溶液中的放射性与待测抗原的含量呈正相关。根据检测过程的操作步骤不同，IRMA 技术又可分为以下几种类型：

1. 直接 IRMA 法　将待测抗原与过量的标记抗体进行温育，使两者结合，然后加入固相抗原免疫吸附剂再次温育，吸附游离的标记抗体。离心去除沉淀物，测定上清液中放射性强度，根据标准曲线即可得知待测样品中抗原的含量。

2. 双抗体夹心 IRMA 法　在待测抗原内依次加入固相抗体和标记抗体，反应后形成固相抗体（Ab1)-抗原-标记抗体（Ab2）复合物，洗涤去除游离的标记抗体，测定固相抗体（载体）上免疫复合物的放射性强度，根据标准曲线即可得知待测样品中抗原的含量。此法仅用于检测有多个决定簇的多肽和蛋白质抗原。

3. 间接 IRMA 法　此法是在上述双抗体夹心法的基础上，进一步改良为用放射性同位素标记第二抗体（Ab2）的抗体（Ab3），反应后形成固相抗体(Ab1)-抗原-Ab2-Ab3（标记的抗 Ab2）的四重免疫复合物。其中，Ab3 可作为通用试剂，可省去标记针对不同抗原的特异性抗体。

4. BSA-IRMA 法　是将生物素-亲合素系统（BSA）引入免疫放射分析，而建立的新一代 IRMA。此法最大的优点是使用生物素化抗体和以放射性同位素标记的亲合素为示踪剂，可以通用于甾体类激素、前列腺素等小分子物质的检测。由于 1 个抗体分子上可载有数十个生物素分子，而每个亲合素又可与 4 个生物素分子结合，从而产生多级放大效应。同时生物素与亲合素之间的亲和力要比抗原抗体间的亲和力大 10 万～100 万倍，两者结合极为稳定。因此，使其灵敏度、特异性和精密度都大大提高。目前一些超灵敏度的 IRMA 分析试剂盒就是应用上述原理制成的。

该法所用试剂及材料主要包括：①标记抗体；②固相抗原吸附剂；③标准抗原；④待测样本；⑤γ 计数仪和低温离心机。

［临床应用］

放射免疫分析与免疫放射分析常用于测定各种激素（如甲状腺激素、性激素、胰岛素等）、微量蛋白质、肿瘤标志物（如 AFP、CEA、CA125、CA19-9 等）和药物（如苯巴比妥、氯丙嗪、庆大霉素等）等。各种检测项目均有试剂盒供应，而且仪器设备并不昂贵，故国内目前仍广泛应用。但由于放射性对人体有一定的危害性，必须加以防护，实验室的建设须经防疫部门的监督，操作人员须经过特殊训练，以及常用的放射性同位素半衰期短影响试剂盒的货架寿命，这些都使这种分析技术的应用受到一定限制。

第四节　酶联免疫吸附实验（ELISA）

［概述］

酶免疫技术是将抗原抗体的特异反应和酶的高效催化作用相结合的一种免疫学技术。1966 年 Nakane 和 Avrameas 等分别报道用酶替代荧光素标记抗体进行免疫组化的方法；20 世纪 70 年代初，Engrall 等和 van Weemen 等分别建立了酶联免疫吸附实验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA），此法是将抗原或抗体制成固相制剂，在与标本中抗体或抗原反应后，只需经过对固相的洗涤，就可以达到抗原-抗体复合物与其他物质的分离，再加入酶标记物（酶标记抗体或抗原）进行特异反应和酶对其底物的催化作用产生呈色物质。测定呈色强度即可了解待测标本中抗原或抗体的水平。大大简化了操作步骤。ELISA 技术是目前临床检验中应用较广的免疫测定方法。

［原理与实验方法］

ELISA 的原理是将待测抗原或抗体先与包被于固相载体表面的抗体或抗原特异结合，形成固相，再用酶标记的抗体或抗原与已被固定的相应抗原或抗体发生特异性反应，待加入酶底物/色原后呈色，呈色程度（用 *A* 值表示）与待测抗原或抗体的水平呈相关关系。此法常用多孔聚苯乙烯反应板作为固相载体，读取结果需用酶联检测仪。有以下几种基本反应模式。

1. 间接法　用于检测样本中特异性抗体。将已知特异性抗原包被于聚苯乙烯板微孔，形成固相抗原；洗弃未包被抗原（洗板，下同）；加稀释的待检样本，若其中含特异性抗体则与固相抗原结合形成抗原抗体复合物；洗板，加酶标记抗抗体（一般为酶标记的抗人 IgG、抗人 IgM 或葡萄球菌 A 蛋白），使在固相载体上形成抗原—待检抗体—酶标记抗体复合物；洗弃未反应的成分，加酶底物/色原呈色，在一定波长下测 *A* 值判定待测抗体的有无和水平。

2. 竞争法　用于检测待检样本中未知抗原或抗体。测抗原时用已知抗体

包被固相载体，然后同步加入含有待测抗原的样本和酶标记抗原，使待测抗原与酶标记抗原竞争结合固相载体上的抗体；洗板；加酶底物/色原呈色。待测溶液抗原量越多，则被结合的酶标记抗原量越少，呈色越浅，呈色深浅与待测抗原的量成反比。测未知抗体时用已知抗原包被固相载体，同步加入含有待测抗体的标本和酶标记特异抗体，两者竞争结合固相载体上的抗原，待测抗体量越多，酶标记抗体与固相抗原结合的量就越少，呈色就越浅，待测抗体的水平与呈色程度成反比。

3. 双抗体或双抗原夹心法　双抗体夹心法用以检测较大相对分子质量的蛋白质抗原。先将已知特异性抗体包被于固相载体上，加待测样本，若其中有相应的抗原则与固相抗体特异性结合；洗板后加入酶标记特异性抗体，使在固相上形成包被抗体-待测抗原-酶标抗体复合物；洗板、加酶底物/色原溶液呈色。双抗原夹心法则是利用包被抗原和酶标记抗原检测样本中的特异性抗体。夹心法所测抗原或抗体的水平与呈色程度（*A* 值）正相关。

4. 捕获法　常用于检测样本中的 IgM 类抗体。先将抗人 μ 链抗体包被于固相载体上，加待测人血清，其中的 IgM 分子被抗 μ 链捕获，与固相抗体特异性结合；洗板后加入特异性抗原，再加入酶标记的抗该抗原的特异抗体，使在固相上形成抗 μ 链-IgM 类抗体（待测血清）-抗原-酶标记抗体复合物；洗板、加酶底物/色原溶液呈色。在一定波长下测 *A* 值判定待测 IgM 类抗体的水平。

5. 生物素-亲合素 ELISA（avidin-biotin-peroxidase complex，ABC-ELISA）是将生物素（biotin）和亲合素（avidin）或链霉亲合素（streptavidin，SA）引入 ELISA 的方法。生物素是一种小分子物质，经活化后可高比度的耦联抗体或抗原等大分子。亲合素（或链霉亲合素）与生物素的结合力极强，一分子亲合素可与 4 个生物素分子结合。在反应系统中引入生物素和酶标记亲合素，可将 ELISA 的反应多级放大，显著提高检测方法的敏感性。

目前各种 ELISA 实验均有商品化的专用试剂盒，不需自己配置。试剂盒中通常配置的试剂有以下一些：

（1）标记用酶：最常用辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记各种抗体、抗原或亲合素。

（2）底物与色原：HRP 的底物是 H_2O_2，催化时需供氢体参与，后者多为还原性染料，通过反应生成深色的或有荧光的氧化型染料。HRP 可用的色原（供氢体）很多，常用的为邻苯二胺（OPD），3，3′，5，5′-四甲基联苯胺（TMB），四甲基联苯胺硫酸盐（TMBS）等。H_2O_2 与色原常在实验前混合。

（3）包被液：pH 9.6 碳酸盐缓冲液。

（4）洗涤液：0.02mol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液，含 0.05% Tween 20。

（5）终止液：2mol/L H_2SO_4。

［结果分析］

ELISA 实验的结果分析分定性和定量两种。目前规定，临床标本的检测，均应用酶联检测仪测定后报告。用于定性和定量结果分析的方法主要有：

1. P/N 比值　即［待测样本吸光度（A）值－空白对照 A］/［阴性对照 A－空白对照 A］。一般以 P/N≥2.1 为阳性。

2. S/CO 比值　S 为待测样本吸光度（A）值，CO 为 cut off 值，常以阴性对照平均 A 值×2.1 代表 CO 值。一般以 S/CO≥1.0 为阳性，竞争法以 S/CO<1.0为阳性。

3. 标准曲线单位　将已知浓度或活性单位的标准抗原或抗体在实验系统中进行反应，分别测定 A 值，以 A 值为纵坐标，抗原或抗体水平为横坐标，绘制标准曲线。待测样品根据其所测 A 值由标准曲线获得定量单位。

［临床应用］

ELISA 法最常用于以下检测，并有商品试剂盒供应。

1. 病原体或其抗体　如肝炎病毒、艾滋病病毒、风疹病毒、疱疹病毒、SARS 冠状病毒、军团菌、结核分枝杆菌、幽门螺杆菌、弓形虫、血吸虫、梅毒螺旋体、肺炎衣原体等。

2. 蛋白质　各种免疫球蛋白、补体组分、肿瘤标志物（例如甲胎蛋白、癌胚抗原、前列腺特异性抗原和各种糖链抗原等）、各种血浆蛋白质（如 CRP、cTnT、cTnI 等）、激素蛋白（如 HGG、FSH、TSH）等。

第五节　胶体金标记技术

胶体金标记技术是以胶体金（colloiadl gold，CG）作为示踪标志物，应用于抗原抗体反应的一种免疫标记技术。由于胶体金具有高电子密度，并能与多种生物大分子结合，已成为继荧光素、放射性同位素和酶之后，在免疫标记技术中较常用的一种非放射性示踪剂。

［概述］

1971 年，Faulk 和 Taylor 首先报道将胶体金与抗体结合，应用于电镜水平的免疫细胞化学研究。1974 年，Romano 等用胶体金标记抗球蛋白抗体，建立间接免疫金染色法。1978 年，Geohegan 等将胶体金标记抗体用于普通光学显微镜镜下检测 B 淋巴细胞表面膜免疫球蛋白，建立了光镜水平的免疫金染色（immunogold staining，IGS），但所需胶体金颗粒必须大于 20nm，且标记

物浓度要高，才能获得阳性结果。1981 年 Danscher 用银显影方法增强金颗粒的可见度，提高了灵敏度。1983 年，Holgate 等又加以改进，将免疫金染色与银显影技术相结合，称为免疫金银染色法（immunogold silver staining，IGSS）。由于 IGS 和 IGSS 两种方法具有试剂制备简便，灵敏度高，并可用于双重和多重标记等优点，被广泛应用于医学和细胞生物学研究领域，是目前免疫组织化学技术中较常用的敏感方法之一。近年来，胶体金标记技术进一步发展应用于免疫转印、流式细胞术（flow cytometry，FCM）、液相免疫测定、固相斑点金/银染色（dot IGS/IGSS）、斑点金免疫渗滤测定法（dot immunogold filtration assay，DIGFA）和免疫金层析技术（immunogold chromatographic assay，ICA）等多种免疫检测方法。

胶体金是由氯金酸（chloroauric acid，$HAuCl_4$）在还原剂如白磷、维生素 C、枸橼酸钠和鞣酸等作用下，聚合成特定大小的金颗粒（常用的为直径 5～20nm 颗粒），并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态，故称为胶体金。利用它在碱性环境中带负电荷的性质，与蛋白质分子的正电荷基团借静电吸引而形成牢固结合。除抗体蛋白外，胶体金还可与其他多种生物大分子，如 SPA、PHA、ConA 等结合。根据胶体金的一些物理特性，如高电子密度、颗粒大小、形状及颜色反应，加上结合物所具有的免疫生物学特性，使其在免疫学、组织学、病理学及细胞生物学标记研究工作中得到广泛应用。

［原理与实验方法］

1. 斑点金免疫渗滤实验（DIGFA） DIGFA 是以硝酸纤维素（NC）膜为载体，在膜中央包被抗体，使固相化。检测时依次将标本及胶体金标记的抗体滴加在膜上，通过渗滤而逐步反应。阳性结果在膜上呈现红色斑点，阴性反应则不显色。检测待测血清中的抗体时，用特异抗原包被 NC 膜，使固相化。实验时依次加标本和胶体金标记的抗人 IgG（或金黄色葡萄球菌 A 蛋白）。DIGFA 每次加液渗入盒内所需时间不到 3 分钟，全部实验过程可在 5 分钟内完成。此法已成功地用于人类免疫缺陷病毒（HIV）感染疾病的诊断，及用于血清中甲胎蛋白和自身抗体（如抗 dsDNA 抗体）的检测。

2. 免疫金层析实验（ICA） ICA 也是以硝酸纤维素（NC）膜为载体，但利用了 NC 膜的毛细管效应，滴加在膜条一端的液体慢慢向另一端渗移，犹如层析一般。以单克隆双抗体夹心法测抗原为例。实验所用试剂全部为干试剂，多个试剂被组合在一个约 6mm×70mm 的塑料板条上，试剂条上端和下端分别粘贴吸水材料，金标记单克隆抗体干片粘贴在近下端处，紧贴其上为 NC 膜条。NC 膜条上有两个反应区域，测试区包被有特异的单克隆抗体，参照区包被有抗小鼠 IgG。测定时将试条下端浸入液体标本中，吸水材料即吸取液体向

上端移动，流经黏贴金标记单抗处时使干片上的金标记单抗复溶，并带动其向膜条渗移。若标本中有待测特异抗原，就可与金标记单抗结合，此抗原抗体复合物流至测试区即被固相单克隆抗体捕获，在膜上显出红色反应线条。过剩的金标记单抗继续前行，至参照区与固相小鼠 IgG 结合（金标记的单克隆抗体为小鼠 IgG），而显出红色质控线条。反之，阴性标本则无反应线条，而仅显示质控线条。

［临床应用］

胶体金标记技术由于标记物的制备简便、方法敏感、特异，不需使用放射性同位素或有潜在致癌性的酶显色底物，应用范围广。临床上检测的主要项目包括：正常体液中不存在的物质（例如诊断传染病中的抗原或抗体，包括抗 HBV、抗 HCV、抗 HIV 及梅毒患者的抗密螺旋体抗体等）以及正常含量极低而在特殊情况下异常升高的物质（如心肌肌钙蛋白、HCG、抗 dsDNA 自身抗体等），且一些新的测定项目还正在不断发展之中。由于该技术操作简便、快速，常用于床边检测。

第六节　免疫荧光分析

［概述］

免疫荧光分析（immunofluorescence assay，IFA）始创于 20 世纪 40 年代初。1942 年 Coons 等首次报道用异氰酸荧光素标记抗体，检查小鼠组织切片中的可溶性肺炎球菌多糖抗原。当时由于此种荧光素标记物的性能较差，未能推广使用。直至 20 世纪 50 年代末期。Riggs 等于 1958 年成功合成了性能较为优良的异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）。同年，Marshall 等对荧光抗体的标记方法又进行了改进，从而使免疫荧光技术逐渐推广应用。半个多世纪以来，经过许多学者不断改进和发展，使此项技术成为微生物学、免疫学、免疫组织化学中常用的一种免疫学实验方法。70 年代以来，根据放射免疫和酶免疫测定的原理，又进一步发展建立了各种免疫荧光分析技术（immunofluorescence assay，IFA），下面分别进行概要介绍。

一、免疫荧光分析技术

［原理］

IFA 是将抗原抗体反应的特异性和敏感性和荧光示踪的敏感性相结合的一种技术。以荧光素作为标记物，与已知的抗体（或抗原）结合、但不影响其免疫学特性，用于检测和鉴定未知的抗原（或抗体）。在荧光显微镜下，荧光素

受紫外线或蓝紫光照射激发，发出荧光，起示踪作用，因而可以直接观察呈现特异荧光的抗原抗体复合物及其存在部位。常用的有以下几种方法：

1. 直接法　用已知抗体检测未知抗原，荧光素标记的是已知抗体。于待检标本片上滴加荧光抗体，经反应和洗涤后在荧光显微镜下观察。标本中如有相应抗原存在，即与荧光抗体特异结合，在镜下可见发荧光的抗原抗体复合物。多用于病理标本中某些病原体（如军团菌、梅毒螺旋体）的检出。

2. 间接法　用已知抗原检测未知抗体，荧光素标记的是抗人 IgG（或抗人 IgM）抗体。检测过程分为两步：首先在含有已知抗原的标本片上，滴加待测血清，温育和洗涤后血清中如含有待测抗体，既可与固相抗原结合，再滴加荧光素标记的抗人 Ig 抗体。固相上即形成抗原-抗体-标记抗抗体复合物，并显示特异荧光。亦可用荧光素标记葡萄球菌 A 蛋白代替标记抗人 Ig 抗体，但敏感性略低。此法常用于各种自身抗体的检测。

3. 双标记法　此法是用两种荧光素（常用异硫氰酸荧光素和异硫氰酸四甲基罗丹明）分别标记所需的特异性抗体，用于检测同一标本内的不同抗原。镜检时可以同时见到两种荧光（黄绿色和红橙色）。此法主要用于细胞表面抗原和受体的研究及某些疾病的诊断。

二、时间分辨荧光免疫分析

时间分辨荧光免疫分析（time-resolved fluoroimmunoassay，TrFIA）建立于 20 世纪 80 年代初期，是在免疫荧光分析的基础上发展的一种新型超微量免疫分析方法。以荧光素作为标记物的 IFA 往往受血清成分、试管、仪器组件等的本底荧光干扰，以及激发光源的杂射光的影响，使灵敏度受到很大限制。TrFIA 则采用镧系稀土元素标记抗体，利用荧光发射体的荧光寿命差别将波长相同的荧光分开，待短寿命的自然本底荧光完全衰退后再行测定，所得信号完全为长寿命镧系螯合物的荧光，从而有效地消除非特异性本底荧光的干扰。该方法在灵敏度、特异性、稳定性及测量自动化等方面都优于 RIA 法，最小检出值可达 10^{-8}mol/L（或 0.2～1ng/ml），且无放射性污染。

［原理］

镧系稀土元素铕（Eu^{3+}）、钐（Sm^{3+}）等通过具有双功能基团的螯合剂，与抗体分子以共轭双键结合制成标记物。当标记抗体和抗原结合后，稀土元素螯合物在紫外光（340nm）激发下，不仅发射出高强度的荧光（613nm），而且衰变时间较长（10μs～1ms），而待测样品中各种无关蛋白质的荧光和其他化合物的非特异荧光的衰变时间一般在 1～10ns，最长不超过 20ns。利用延缓测量时间，待样品中的非特异的短寿命荧光全部衰变后，再测量稀土元素螯合

物的特异荧光，就可以完全排除非特异本底荧光的干扰。

［实验方法］

在时间分辨荧光免疫分析仪上进行操作，使用仪器配套试剂，并由仪器自动打印结果报告。

［结果分析］

以不同稀释度的抗原浓度标准品为横坐标，以相应的荧光强度为纵坐标绘制标准曲线，从标准曲线上就可确定得知待测样品中所测抗原的相应含量。

［临床应用］

IFA 在临床检验上已用做细菌、病毒和寄生虫的检验及自身免疫病的诊断等。在细菌学检验中主要用于菌种的鉴定，如对脑膜炎奈瑟菌、痢疾志贺菌、霍乱弧菌、布氏杆菌和炭疽杆菌等的实验诊断有较好效果。对梅毒螺旋体抗体的检测是梅毒特异性诊断常用方法之一。在寄生虫感染诊断中，IFA 被认为是当前公认的最有效的检测疟疾抗体的方法。该技术在自身免疫病的实验诊断中亦应用广泛，主要包括对抗核抗体（ANA）、抗双链 DNA 抗体、抗组织细胞抗体、抗平滑肌抗体和抗线粒体抗体等的检测。而 TrFIA 则多用于一些小分子激素、药物和肿瘤标志物的测定。

第七节　发光免疫分析

［概述］

20 世纪 60 年代即有人利用化学发光法测定水样中细菌含量和菌尿症患者尿液检查。1977 年 Halman 等将化学发光系统与抗原抗体反应系统相结合，创建了化学发光免疫分析法，保留了化学发光的高度灵敏性，又克服了它特异性不足的缺陷。1996 年推出的电化学发光免疫技术，在反应原理上又具有一些新的特点。由于这两类技术具有明显的优越性：①灵敏度高，甚至超过 RIA；②精密度和准确性均优于 RIA；③试剂稳定，无毒害；④测定耗时短；⑤测定项目多；⑥已发展成自动化测定系统。因此在免疫学检验中已逐步得到广泛的应用。

一、化学发光免疫分析法

［原理］

化学发光免疫分析法（chemiluminescence immunoassay，CLIA）是把免疫反应与发光反应结合起来的一种定量分析技术，既具有发光检测的高度灵敏性，又具有免疫分析法的高度特异性。在 CLIA 中，除免疫反应系统（即抗原

抗体反应系统）外其分析主要依赖化学发光系统，是利用某些化合物如鲁米诺（luminol）、异鲁米诺（isoluminol）、金刚烷（AMPPD）及吖啶酯（AE）等经氧化剂氧化或催化剂催化后成为激发态产物，当其回到基态时就会将剩余能量转变为光子，随后利用发光信号测量仪器测量光量子的产额。将发光物质直接标记于抗原（称为化学发光免疫分析）或抗体上（称为免疫化学发光分析），经氧化剂或催化剂的激发后，即可快速稳定的发光，其产生的光量子的强度与所测抗原的浓度可成比例。发光免疫分析的灵敏度高于包括 RIA 在内的传统检测方法，检测范围宽，测试时间短，仅需 30～60 分钟即可。试剂货架寿命长，稳定性好，具有大规模自动化测试的功能。

这项技术发展很快，已有许多厂商生产各具特色的测定仪器与配套试剂。目前我国仪器与试剂均需进口，测定成本较高。其反应过程分为两个阶段：

1. 待测抗原（Ag）和一定量的碱性磷酸酶标记抗原（ALP-Ag）同时与一定量的特异性抗体（Ab）竞争结合，即待测 Ag 的量越多，结合（消耗）Ab 的量就越多，标记抗原（ALP-Ag）结合 Ab 的量越少。反之也然。

2. 加入羊抗鼠抗体包被的磁性颗粒，捕获 ALP-Ag 与 Ab 的结合物（其中的 Ab 为鼠单克隆抗体），经洗涤并吸弃废液后，加入化学发光底物（dioxetane-phosphate，AMPPD），后者在 ALP 的作用下迅速分解并同时释放出光子，光子的生成量与待测抗原（Ag）的量成反比。将一系列已知浓度的标准液与待测标本同样处理，即可绘出标准曲线并据此查出标本中待测抗原的浓度。

［实验方法］

全部操作均需使用化学发光仪和配套试剂。由于目前引进的化学发光测定仪自动化程度极高，只需分离血清上机，包括加样、分离、搅拌、温育、测定、打印结果在内的各项操作均自动进行。

二、电化学发光免疫分析

电化学发光免疫分析（electro chemiluminescente immunoassay，ECLIA）是新近发展起来的既不同于传统的标记免疫分析，也与普通的化学发光有区别的一种新型检测方法。它将电化学和化学发光巧妙结合起来，具有灵敏、快速、准确、分析适应性广等特点。ECLIA 为电促发光，是发生在电极表面由稳定的前体产生的具有高度反应性的化学发光反应。其发光反应的物质基础为三联吡啶钌［$Ru(bpy)_3^{2+}$］络合物和三丙胺（TPA）两种电化学活性底物。［$Ru(bpy)_3^{2+}$］很稳定，经化学修饰后，易与蛋白质、激素、核酸、半抗原等分子结合，且能在 ECLIA 系统中循环利用，延长发光时间，增强发光强

度，故具更为广泛的分析适应性。

［原理］

ECLIA 的体系中主要有两个部分，即免疫反应系统和电化学发光系统。前者即抗原抗体反应系统，后者包括电化学和化学发光两个过程。在电极表面的电场作用下，二价的三联吡啶钌［Ru（bpy）$_3$］$^{2+}$失去一个电子，成为三价的三联吡啶钌［Ru（bpy）$_3$］$^{3+}$，三丙胺（TPA）也失去一个电子被氧化随即脱氢成三丙胺自由基。三丙胺自由基传递一个电子给三价的三联吡啶钌使还原成激发态的二价三联吡啶钌［Ru（bpy）$_3$］$^{2+}$，后者很不稳定，以发射一个波长为 620nm 的光子的形式释放能量而回到基态。这个过程可反复进行，直到电场中的三丙胺耗尽。因此测定过程中的一个抗原-抗体复合物可产生许多光子信号，从而产生生物放大效应，极大地提高了方法的灵敏度。此外测定方法还应用了链霉亲合素-生物素技术、磁性分离技术等，使其准确性、灵敏度以及自动化程度都很高。

［实验方法］

ECLIA 仪的自动化程度极高，所用试剂均为仪器配套的专用试剂，实验时只需分离血清上机，包括加样、分离、搅拌、孵育、测定、打印结果在内的各项操作均自动进行。具体如下：

1. 待测抗原（Ag）、一定量的生物素化抗第一位点单克隆抗体（Ab*）和三联吡啶钌［Ru（bpy）$_3$］$^{2+}$标记的抗第二位点单克隆抗体于反应体系中相互结合，形成大相对分子质量的抗原-抗体“夹心”复合物。

由于上述的两种单克隆抗体在试剂中都是定量的，因此待测抗原的量与抗原-抗体复合物的量成正的线性关系。

2. 加入链霉亲合素包被的磁性微粒，通过生物素与链霉亲合素的反应使上述的大分子复合物被吸附于磁性微粒上。

3. 磁性微粒被工作电极下的磁铁吸附于电极表面，洗去未结合的游离物，加入含 TPA 的缓冲液，同时给电极加压产生化学发光，并启动光电倍增管检测光子强度。光子强度与三联吡啶钌的浓度亦即抗原-抗体复合物的量呈线性相关。检测结果由仪器自动从标准曲线上查出，此曲线由试剂条形码扫描入仪器并通过两点定标校正。

［临床应用］

目前，CLIA 与 ECLIA 主要用于临床各类肿瘤标志物和小分子激素等的检查，现已开展的检查项目包括：甲胎蛋白（AFP），癌胚抗原（CEA），糖类抗原（CA19-9、CA125、CA15-3、CA242、CA72-4 等），神经元特异烯醇化酶（NSE），细胞角蛋白 19 片段（cyfra21-1）与前列腺特异抗原（PSA）等

肿瘤标志物；以及人绒毛膜促性腺激素（HCG），促黄体素（LH），卵泡刺激素（FSH），甲状腺激素（T_3、T_4），促甲状腺激素（TSH），睾酮（T），雌二醇（estradiol-17β，E_2），雌三醇（estriol，E_3）和孕酮（progesterone，P）等激素。

第八节 免疫印迹

［概述］

1979 年 Towbin 等将分析 DNA 的 Southern Blotting 技术应用于蛋白质研究领域，并与特异灵敏的免疫分析技术相结合，称之为 Western Blotting，也称免疫印迹。该技术是以生物物理学方法（凝胶电泳高效分离）和免疫化学特异性反应（固相免疫测定）相结合而建立的一种技术。它是将混合的蛋白质溶液借助高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）分成许多蛋白条带，分离后的蛋白条带经电转移至一种固相支持体如硝酸纤维素（NC）膜上，然后以抗体为探针，与附着于固相支持体的靶蛋白抗原表位发生特异性反应，结合于固相支持体的抗体可用多种 2 级免疫学试剂（如 ^{125}I、胶体金、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的 A 蛋白或抗免疫球蛋白等）检测。根据参考蛋白质的分子量对数与迁移率制备的标准曲线，由未知蛋白质的迁移率可查出其分子量，也可用于未知抗体的检测。常规工作中最简便的方法是与标准的条带图谱比对，判定待测物质的性质。

［原理］

蛋白质样品首先经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），将各组分依相对分子质量大小分离成电泳迁移率不同的区带，再通过直接转印或电转印将各条带从凝胶上精确地转印到硝酸纤维素膜（NC）上，再将已转印的 NC 膜浸于酶（或胶体金或放射性同位素）标记的特异性抗体中，待特异性抗体与相应靶抗原反应后，加酶底物/色原（放射性核素标记者则用放射自显影法）使特异性条带呈色而被识别出来。该技术检测分子量中等大小的蛋白质最低限为 1～5ng。

［试剂］

依检测目的不同，购置专用试剂盒。试剂盒中应含各种缓冲液、洗涤液、稀释液，一定浓度的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶，相应范围分子量的蛋白质标准（marker），转印用的 NC 膜（或其他材料的膜），分析用的靶抗原溶液（如核抗原，HIV 1＋2 抗原，重组 HCV 抗原等），标记抗体（同位素标记抗体应配套放射性自显影的试剂与材料，酶标记抗体应配套底物系统和显色后的稳定

剂，胶体金标记抗体需配银染液）。商品试剂盒中目前多配备已转印的 NC 膜条，可省却 SDS-PAGE 和转印的相应试剂与材料。

［实验方法］

免疫印迹法主要包括三个方面的步骤，即凝胶电泳、样品的转印及样品的检测与鉴定。

1. 蛋白质的凝胶电泳分离　采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）。将蛋白质抗原按分子量大小和所带电荷的不同在凝胶中分成不同的区带，这是一种以聚丙烯酰胺凝胶为支持物的区带电泳。该凝胶是由单体丙烯酰胺（$CH_2=CH\text{-}CO\text{-}NH_2$）和交联共聚单体 N，N'亚甲双丙烯酰胺聚合交联而成，具有三维空间的凝胶网络结构，并可通过控制凝胶浓度制成具有不同孔径的凝胶。为免疫印迹所进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳为平板电泳。

2. 电转印　目的是将蛋白质按凝胶电泳分离的谱式转移至 NC 膜或尼龙膜或聚偏乙烯氟化物（PVDF）膜上，使其固相化。转移的方法包括半干式转印、湿式转印等。各种转移方法原理相似，都是将膜与胶放在中间，上下加滤纸数层，并且保证带负电的蛋白质向阳极转移，即膜侧连接阳极或面向阳极。

3. 样品的检测与鉴定　该步骤是将已转印但肉眼不能见到的抗原带显示出来。将转印膜用封闭剂（如脱脂奶粉溶液）封闭膜上非特异结合位点。以用酶标记抗抗体检测抗 HIV 1+2 抗体为例。在已封闭的膜上加待测血清，反应一定时间后洗涤；洗后的膜浸入工作浓度的辣根过氧化物酶标记的兔或羊抗人 Ig 的反应液中，反应一定时间后洗涤；洗后的膜浸入含有稳定剂 DONS（丁二酸二辛酯磺酸钠）的底物/色原溶液（如 H_2O_2/DAB）中，待阳性对照出现典型的呈色条带时，用蒸馏水洗膜，再用 DONS 水溶液浸洗固定。

目前，在免疫学检验中所用的免疫印迹技术，都有商品试剂盒，可按试剂盒说明书操作。

［临床应用］

免疫印迹临床应用最多的是艾滋病的血清学诊断，即用于抗 HIV 抗体的确认；丙型病毒性肝炎的确诊实验（HCV 重组抗原免疫印迹分析）和抗核抗体（如 ENA 多肽抗体谱）等项目的实验室检查。

第九节　流式细胞术

［概述］

流式细胞术（flow cytometry，FCM）是 20 世纪 70 年代发展起来的一种利用流式细胞仪对细胞等生物粒子的理化及生物学特性（细胞大小、DNA/

RNA 含量、细胞表面抗原表达等）进行多参数检测分析的技术。该技术集单克隆抗体术、激光、细胞计数及电子计算机技术之大成，并借鉴了荧光抗体与血细胞分析仪原理，大大提高了检测速度与精确性。每秒钟可测数千至数万个细胞，短时间内即可得到大量相关信息。目前已经成为日益完善的细胞分析和分选的工具。FCM 的功能包括：

1. 细胞表型分析（celluar phenotype）。
2. DNA 含量及细胞周期分析（DNA content analysis）。
3. 细胞内及核膜成分分析。
4. 细胞分选。
5. 自身抗体检测等。

［原理］

流式细胞术原理是将待测细胞经特异性荧光染料染色后放入样品管中，在气体的压力下进入充满鞘液的流动室，在鞘液的约束下细胞排成单列由流动室的喷嘴喷出，形成细胞柱，一个个依次通过测量区（该测量区是激光与液流交汇处）并进行逐个检测，当带有特异性荧光标记抗体的细胞暴露于一定波长（如 488nm）的激光束时，染色的细胞即发出荧光，而荧光染料受到激光激发，也会释放出一定波长的光，从而得到了该细胞的光散射和荧光指标。通过区分这些不同波长的散射光和荧光信号，并分别送到不同的光电倍增管中，经过一系列的信号转换、放大和数字化处理，计算机即可直观地统计染上各种荧光染料的细胞各自的百分率。如果选择不同的单克隆抗体及荧光染料，还可以利用 FCM 同时测定一个细胞上的多种不同参数，以进一步分析出其体积、内部结构、DNA、RNA、蛋白质、抗原等物理及化学特征。因此，其具体工作流程包括标本处理与荧光染色，激光聚焦检测，流动控制，信号的处理与放大，以及计算机管理和结果打印。

［实验方法］

根据分析样本（如组织细胞或体液）、分子种类及检测目的的不同，流式细胞术可分为如下几种方法。

1. 流式细胞计数分析　该技术特点是对混合细胞群体中的亚群细胞进行分类计数，如淋巴细胞可依其表面标志的不同分为 T 淋巴细胞（$CD3^+$）、B 淋巴细胞（$CD19^+$）、NK 细胞（$CD16^+56^+/CD3^-$），T 淋巴细胞又可进一步分为辅助/诱导 T 淋巴细胞（$CD3^+CD4^+CD8^-$）和抑制/细胞毒 T 淋巴细胞（$CD3^+CD4^-CD8^+$）等。这些亚群细胞计数过去多以相对百分比表达结果，用 FCM 分析则可得出在单位体积血液中的绝对数量。

2. 定量流式细胞术（quantitative flow cytometry，QFCM）　单细胞的抗

原或受体定量分析是流式细胞术的重要进展，以往细胞的多种成分（如某些抗原或受体表达）的流式细胞分析，多以平均荧光强度（MFI）或相对荧光强度（RFI）表达其含量，不能提供更加准确的信息。QFCM 定量分析主要有两种：

（1）定量抗体微球法：在特制的微球上包被已知分子数的羊抗鼠 IgG 分子，再将包被不同分子数的微球混合，形成含不同羊抗鼠 IgG 分子数的混合微球，此微球与待测标本在相同条件下与荧光素标记的单克隆抗体（McAb）反应后在流式细胞仪上测定其荧光强度，根据微球上所包被的羊抗鼠 IgG 分子数和与之对应的荧光强度计算回归方程，再将待测样本中阳性细胞的荧光强度代入方程即可求得其每个细胞上的平均抗原分子数（抗原结合位点数）。

（2）定量荧光素分子微球法：在特制的微球上直接包被荧光素分子，再将包被不同分子数的微球混合，形成含不同数量荧光素分子的混合微球。在流式细胞仪仪器设置相同的条件下测定此微球及待测细胞的荧光强度，根据微球上所包被的荧光素分子数和与之对应的荧光强度计算回归方程，再将待测样本阳性细胞的荧光强度代入方程，可求得每个细胞上的平均荧光素分子数，根据所用于样本测定的单克隆抗体（McAb）与荧光素结合的分子比例，计算每个细胞上的平均抗原分子数。

［临床应用］

在临床医学领域里 FCM 应用广泛，主要包括以下几个方面：

1. 在肿瘤学中的应用　首先将实体瘤组织解聚、分散制备成单细胞悬液，用荧光染料（碘化吡啶）染色后对细胞的 DNA 含量进行分析，将不易区分的群体细胞分成三个亚群（G_1 期，S 期和 G_2 期），DNA 含量直接代表细胞的倍体状态，非倍体细胞与肿瘤恶性程度有关。

此外，FCM 还被应用于细胞凋亡和多药耐药基因的研究中，通过对细胞体积、光散射、DNA 含量及特异性基因（如 bcl-2，Fas 等）测定分析出细胞凋亡情况，对多药耐药基因（P170 等）、凋亡抑制基因与凋亡活化基因表达的测定，可为临床治疗效果分析提供有力依据。

2. 在临床细胞免疫中的作用　FCM 提供了简捷地检测淋巴细胞亚群的方法，该技术通过荧光抗原抗体检测技术对细胞表面抗原分析，进行细胞分类和亚群分析，测定结果对于人体细胞免疫功能的评估，以及各种血液病、肿瘤的诊断和治疗有重要作用。除此之外，FCM 还可对各种血细胞和组织细胞的表型进行测定分析。

3. 在血液病诊断和治疗中的应用　FCM 通过对外周血细胞或骨髓细胞表面抗原和 DNA 的检测分析，对各种血液病的诊断、预后判断和治疗起着举足轻重的作用。

4. 组织配型与监控移植物的排斥反应　FCM 不但提供了组织兼容性抗原配型快速反应的测定方法，而且可以随时监测免疫排斥反应，常被用做器官移植治疗过程中免疫抑制剂（如环孢素等）的用量与疗程的监控指标。目前已建立的 FCM 方法主要包括如下几个方面。

（1）HLA Ⅰ类和Ⅱ类特异性抗体的流式细胞术筛查。

（2）流式细胞术交叉配型（FCXM）：可在移植术前发现高风险的受者，而且能在术后预报移植物的排斥反应。

（3）活化淋巴细胞亚群测定：利用淋巴细胞的活化标志（HLA-DR）、结合分型标志采用双色荧光可测出活化的 $CD8^+$ 细胞（代表活化的细胞毒性 T 细胞）和活化的 $CD16^+$ 细胞（代表活化的 NK 细胞）升高，预测排斥反应的发生。常用于监测心脏移植病人的排斥反应。

（4）尿液流式细胞术（UFC）：能检出亚临床排斥反应，为评价移植物（肾脏）功能紊乱的有用工具。通过检测尿沉淀细胞的 HLA-DR 与 CD14、CD45、CD3 的表达不同，区别急性和慢性排斥反应。

（5）定量测定白细胞内的 CMV 抗原，若单核细胞或淋巴细胞内 CMV 抗原阳性则预示可能 CMV 的活动或复发；而在多形核白细胞中检出 CMV 抗原，则系 CMV 相关疾病，如 CMV 肺炎。

5. 在血栓与出血性疾病中的应用　FCM 可以通过荧光标记单抗（血小板膜糖蛋白Ⅱb/Ⅲa，CD62，CD63 等）监测血小板功能及活化情况；测定血小板表面和血清中的相关抗体，用于自身免疫性血小板减少性紫癜的诊断及治疗监测。此外，FCM 也可用于纤维蛋白原结合实验与 von willebrand 因子结合实验，以诊断血小板无力症和血友病。

第十节　免疫学质量控制的基本原则

［概述］

免疫学实验均须严格进行质量管理，其质量控制与生化、微生物、常规临床检验的质量控制一样，对于保证各种免疫学检验的质量，使其具有较高的可重复性、准确性以及各实验室之间结果的可比性都有十分重要的意义。免疫学检验质量控制的原则与方法，大体上与其他检验的质量控制类似，本节简要介绍免疫学检验室内质量控制的一些基本原则。

［实验方法］

同一检测目的的免疫学检测方法常常是很多的，但并非都符合要求。一种理想的免疫学实验方法必须具有较高的敏感性［真阳性/(真阳性＋假阴性)］×

100%、特异性［真阴性/(真阴性＋假阳性)］×100%、有效性［真阳性＋真阴性/(真阳性＋真阴性＋假阳性＋假阴性)］×100%、阳性预测值［真阳性/(真阳性＋假阳性)］×100%、阴性预测值［真阴性/(真阴性＋假阴性)］×100%。应在严格选择患者和非患者对照进行测定的基础上，逐一用上述指标对实验加以评价。只有符合要求的方法，才能用于常规免疫学检验。

［正常上限］

正常上限（阳性与阴性界限）设置得是否恰当，直接关系到实验的特异性与敏感性。设置不当，易产生大量的假阳性和假阴性结果。确定正常上限的原则是要兼顾实验的特异性与敏感性，以避免误诊和漏诊。通常是采用 ROC 曲线（receiver operator characteristic curve）来确定，即选用曲线上敏感性和特异性都处于最佳水平又搭配最好的临界（cut off）值作为正常上限。

［参考品］

1989 年，国际临床化学联合会（IFCC）血浆蛋白标准委员会制备了一种新的人血清蛋白国际参考品（标准品）——CRM 470。这是一种国际二级参考物，1993 年通过欧共体标准局（BCR）鉴定，1994 年被美国病理学会（CAP）认可。CRM 470 包括前清蛋白、清蛋白、α_1 酸性糖蛋白、α_1 抗凝乳酶、α_1 抗胰蛋白酶、铜蓝蛋白、转铁蛋白、触珠蛋白、α_2 巨球蛋白、C3、C4、IgG、IgA、IgM、CRP 等 15 种血浆蛋白，这些标准品的含量都经过严格的标化。常规免疫学检验工作中的室内质量控制，一般用上述参考品标化的正常人混合血清（用于免疫球蛋白、补体及其他血清蛋白质的免疫学实验质控）和病人血清（用于自身抗体的质控），或采用试剂盒提供的质控物。

有关国际统一的参考品通常由 WHO 或 IUIS（International Union of Immunological Societies）制备与提供。

［质量控制］

1. 单向免疫扩散、火箭免疫电泳实验（测定 Ig、补体成分、其他蛋白成分） 每块扩散板上均应用参考品制备标准曲线。

2. 补体溶血活性（CH_{50}、AP_{50}）测定 将混合的新鲜豚鼠血清滴定效价后，小量分装，－30℃保存。每次实验时用做质量控制标准。

3. 细胞免疫（花环实验、淋巴细胞转化实验、膜表面免疫球蛋白、T 细胞亚群等）实验 通过预实验选择合格供者，自静脉取血分离淋巴细胞，混悬于细胞冷冻保存液中，小量分装后置液氮中保存，在每批实验中用做质量控制。流式细胞仪测定时应采用配套的质控物。

4. 免疫复合物测定 每批实验用热聚合人 IgG 进行质量控制。

5. 免疫荧光分析 每批实验均应设阳性与阴性对照。荧光抗体的最适工

作浓度应经常用强阳性、阳性、弱阳性、阴性对照血清核定。

6. 酶免疫实验　免疫组化法应准确选择最适检样浓度和最适酶标抗体浓度，每批实验均应设阳性与阴性对照。ELISA 法均应用酶联检测仪测定吸光度判定结果。每批实验应设阳性与阴性对照。定量测定时每批实验均应用标准品制备标准曲线。血清标本应避免溶血和细菌污染，以防止过氧化物酶样物质造成的假阳性。标本应新鲜，4℃保存不宜超过 5 天，以免因标本中的 IgG 聚合导致本底加深，影响判断。

7. 放射免疫与发光免疫实验　每批实验均应设置阳性与阴性对照，用配套试剂的质控物进行质控，并应用参考品制备标准曲线。

第三章　固有免疫（天然免疫）功能分析

［概述］

固有免疫（innate immunity）或称天然免疫（native immunity）、遗传免疫（inherited immunity），与个体的遗传素质（包括种属、民族、性别及其他遗传控制的抵抗力因素）有关，而与是否遭受病原微生物感染无关。固有免疫与获得性免疫（acquired immunity）不同，后者由传染因子引起，也是特异的针对该传染因子的应答。固有免疫则被认为是机体抵抗不同种类传染因子的天然屏障，不具有特异性。有人鉴于 immunity（免疫）含有特异性之意，建议用“natural resistance”（天然抵抗力）来取代“native immunity”。

固有免疫是与生俱来的一个复杂的防御系统，特点是对“非己”抗原分子的多次刺激反应类似，无免疫记忆性。参与天然免疫反应的物质包括体液物质如补体、溶菌酶、防御素、甘露糖结合凝集素和某些炎性反应物质等；细胞物质如中性粒细胞、单核-吞噬细胞、天然杀伤细胞、释放炎症介质的细胞（嗜碱性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞等）等。这些细胞上的结构识别受体识别病原体上对应的靶分子后，能迅速启动固有免疫应答。

第一节　效应细胞

一、中性粒细胞

中性粒细胞（neutrophil granulocyte，NPG，或 neutrophil leucocyte）是正常人外周血中数量最多的髓细胞系的一种细胞，占白细胞总数的 40%～75%，能游动，寿命短，有多分叶的核，细胞浆中充满嗜天青颗粒和特异性颗粒，后者不能被酸性或碱性染料着染，故称嗜中性颗粒。中性粒细胞具有活跃的吞噬功能和有效的杀菌能力，也能对趋化性刺激物产生强烈反应。在急性炎症性疾病（如急性细菌性感染）时，受 C5a 等趋化因子的吸引，聚集于炎症部位，是病损处的主要的具有免疫活性的细胞。

[免疫学检验]

测定 NPG 功能的方法有：

1. 趋化功能测定　主要包括琼脂糖胶板法和滤膜法，两法原理都是检测 NPG 受趋化因子吸引而定向移动的距离；

2. 黏附功能测定　实验原理是利用 NPG 可粘附于尼龙纤维表面的特点，观察其粘附功能，还可利用 NPG 表面的 CD18/CD11 与相应细胞上配体（ICAM 1-3）结合的特点，采用流式细胞术或免疫组化检测 NPG 上 CD18/CD11 和 CD15。

3. 吞噬与杀菌功能测定　实验原理基于 NPG 可借助于表面的补体受体 CR1 和 IgG 的 Fc 受体 FcγRⅠ（CD64）、FcγRⅡ（CD32）、FcγRⅢ（CD16）识别和吞噬被特异性抗体（IgG）和补体结合的细菌。吞噬后 NPG 的溶酶体中的多种蛋白水解酶和杀菌物质以及代谢过程中产生的大量氧自由基可将细菌杀灭。方法主要包括白色假丝酵母菌法、葡萄球菌法、溶菌法和硝基四氮唑蓝还原实验等。

[临床意义]

NPG 趋化功能缺陷见于 Chediak-Higashi 综合征、迟钝白细胞综合征、肌动蛋白（actin）功能不全症、膜糖蛋白缺陷症、高 IgE 综合征、先天性鱼鳞癣、糖尿病、烧伤、幼年型牙周病、新生儿等。

NPG 吞噬与杀菌功能缺陷常见于慢性肉芽肿、肌动蛋白功能不全症、膜糖蛋白缺陷症、G6PD 高度缺陷症、Chediak-Higashi 综合征等。对白色假丝酵母菌法的吞噬与杀菌缺陷，也见于较严重的白色假丝酵母菌感染与恶性肿瘤患者。

二、单核-吞噬细胞

单核-吞噬细胞系统（mononuclear phagocyte system）起源于骨髓内的前单核细胞。外周血中的单核细胞是一种大的、阿米巴样游走的吞噬细胞，核有凹陷，占正常人血液中白细胞总数的 2%～10%，在外周血中逗留时间很短，半衰期仅 24 小时，然后进入组织分化为各种吞噬细胞。单核-吞噬细胞具有抗感染、抗肿瘤、参与免疫应答和免疫调节等多种生物学功能。因能捕捉、加工处理抗原，将抗原递呈给抗原特异性淋巴细胞，故又称抗原递呈细胞。这类细胞具有黏附玻璃和塑料表面的特性。它们有复杂的表面标志（MHCⅡ类分子，补体受体 CR1、CR3，IgG 的 Fc 受体，IgE 的 Fc 受体，CD11/CD18，CD13，CD14，CD15，CD68，CD86、CD91 等），能产生各种溶酶体酶、溶菌酶、髓过氧化物酶，各种细胞因子如 IL-1、IL-3、TNF-α、CSF，多种补

体成分（C1、C2、C4、C5）。这些都是单核-吞噬细胞生物学功能的物质基础。

［免疫学检验］

检测单核-吞噬细胞吞噬功能的方法有斑蝥发泡法，即用斑蝥酊在前臂皮肤上发泡，自泡液中获取单核-吞噬细胞与某种可被吞噬而又易于计数的颗粒（如鸡红细胞）作用后，根据吞噬颗粒物质的多少，计算吞噬率和吞噬指数，粗略地了解单核-吞噬细胞的吞噬功能。

［临床意义］

恶性肿瘤患者的单核-吞噬细胞吞噬率和吞噬指数均降低。

三、NK 细 胞

NK 细胞即天然杀伤细胞（natural killer，NK），对肿瘤细胞、某些病毒感染的细胞有直接杀伤作用。NK 细胞有与 IgG Fc 端结合的受体（FcγR），与被 IgG 包被的靶细胞连接后可杀死靶细胞，此过程称为“抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用”。此外，NK 细胞还可通过表面的杀伤激活受体识别表达在所有有核细胞上的多种分子，启动对靶细胞的杀伤效应。这种杀伤作用在正常情况下，受杀伤抑制受体调控。由于几乎所有有核细胞都表达 MHC Ⅰ类分子，杀伤抑制受体识别 MHC Ⅰ类分子后，可对杀伤激活受体起抑制作用。病理情况下，当有核细胞与病原体相互作用（如疱疹病毒）或恶性化时，丢失了表面表达的 MHC Ⅰ类分子，使杀伤抑制受体不能传导信号时，NK 细胞就可形成穿孔素（perforin）和颗粒酶（granzymes）进入靶细胞中，注入颗粒酶，杀死异常的靶细胞。

目前国内外多采用检测 NK 细胞活性来研究不同疾病状态下 NK 细胞的杀伤功能。

［免疫学检验］

体外 NK 细胞活性测定的方法较多，常用的有形态学方法、放射性核素释放法、酶释放法、特异性荧光染料释放法以及流式细胞术等。

［临床意义］

NK 细胞活性下降见于大多数肿瘤患者，特别是中晚期或伴有转移的癌症患者；某些白血病和白血病前期患者，NK 细胞活性随病情进展而逐渐降低，以急性期降低最为明显，缓解期患者的 NK 细胞活性也仍低于正常健康对照；柯萨奇病毒、脑心肌炎病毒、流感病毒等感染性疾病 NK 细胞活性下降；某些细菌性和真菌感染疾病患者也见 NK 细胞活性低下；免疫缺陷症 Chediak-Higashi 综合征患者伴有先天性 NK 细胞缺陷；重症联合免疫缺陷症患者体内 T

细胞、B细胞、NK细胞的功能同时缺陷。

NK细胞活性增高见于多发性骨髓瘤、肺结核等疾病。

第二节 效应分子

一、防 御 素

[概述]

防御素（defensin）是一种广泛分布于哺乳动物、昆虫及植物中的非特异性免疫效应分子，为一类重要的酸性阳离子抗菌肽，相对分子质量约40 000～50 000，由18～42个氨基酸组成，分子内含3对二硫键。根据半胱氨酸残基和二硫键位置的不同，哺乳动物防御素被分成三类：α-防御素（即经典防御素）、β-防御素和θ-防御素。迄今为止，相继发现人体中有六种α-防御素（HNP1-4，HD-5，HD-6）和四种β-防御素（HBD1-4）。其中HNP1-4主要存在于人中性粒细胞的嗜苯胺蓝颗粒（azurophil granule）内，故又称为人中性粒细胞肽（human neutrophil peptides，HNP）或髓源性防御素（myeloid defensins）。在NK细胞、γδT细胞、B细胞、单核-吞噬细胞以及一些胃肠道的黏膜上皮细胞中也发现有HNP的表达。HD-5，HD-6存在于小肠潘氏细胞（Paneth cell）中，称为肠源性防御素（enteric defensins）。β-防御素HBD1表达于肾脏、唾液腺导管、胰腺腺泡、阴道上皮细胞中，口腔黏膜、齿龈、腮腺中亦有表达。HBD 2较强表达于肺、气管、包皮细胞中，唾液腺、肾、子宫有弱表达。HBD 3表达于扁桃体、皮肤、呼吸道、生殖道、心脏、骨骼肌、食管等处。HBD 4较强表达于睾丸、胃窦中。θ-防御素目前仅发现存在于吞噬细胞中。

防御素具有广谱的抗病原微生物作用，对细菌、真菌、有包膜病毒、支原体、衣原体、螺旋体等均有直接的杀伤或抑制活性效应。其抗菌过程主要是先通过结构中阳离子精氨酸侧链与细菌膜的阴离子以静电吸引相结合，再通过细菌膜电动势的驱动，插入细菌膜，在膜上形成多聚体，共同构成膜活性结构信道，这些信道融合可破坏膜的完整性，致使细菌内外物质外流或内渗，细菌裂解死亡。防御素的抗菌活性受溶液pH值、离子浓度、温度以及血清蛋白、成熟肽的ADP核糖化修饰等因素的影响。

防御素在固有免疫和获得性免疫中还发挥其他一些生物学活性，如细胞毒性、趋化作用、调理吞噬作用；参与补体激活途径，直接或间接诱导TNF和IL-1等细胞因子产生并促进树突状细胞的成熟，促使记忆T细胞再循环到被

感染组织等作用。

［免疫学检验］

检测血清中防御素可采用 ELISA 和放射免疫法。

［临床意义］

防御素与多种疾病的发生、发展相关。正常人体内 HNP-3 缺失较常见，但也有少数人 HNP1-4 全部缺失，该类病人常易反复遭受一些普通细菌、真菌的感染。体液（如脑脊液、气管灌洗液、尿液、唾液、滑膜液，以及羊水、胸腔积液等）中 HNP 水平显著增高可见于受细菌感染的病人。类风湿关节炎病人的关节滑膜液里，HNP 水平较正常人可高出 10～60 倍；绒毛羊膜炎、羊膜内感染、胎盘感染导致早产等宫内感染病人的羊水中 HNP 水平显著增高。另外，在一些炎症组织的上皮细胞中 HNP 表达也明显增高，如局部性回肠炎、溃疡性结肠炎等胃肠道黏膜上皮细胞，慢性扁桃体炎或增生扁桃体的上皮细胞。

二、补　　体

［概述］

补体是存在于人和脊椎动物体液中的一组具有酶原活性的糖蛋白。补体系统由大约三十多种蛋白和细胞受体组成。世界卫生组织委员会于 1968 年和 1981 年先后对补体各成分的命名作出了统一的规定。即以 C 代表补体；Cn 代表某种单个成分，如 C1～C9；Cn 为活化的补体成分，有酶活性或其他生物学活性；Cn 后加小写的英文字母（a、b、c、d）表示补体活化过程中形成的新生片段，如 C3a、C3b 等；Cni 则表示未活化的补体成分。补体旁路活化途径除 C3 外的各成分，均用大写英文字母，如 B 因子、D 因子等表示，这些蛋白活化后形成的片段、则以小写字母表示。一般较小的片段用“a”，较大的用“b”，如 Ba，Bb。活性丧失，但其肽链结构未发生变化的成分，则在该成分后加“i”，如 Bbi。某种成分因肽链被水解而丧失活性，但未产生新的片段，则在前冠以“i”，如 iC3b。对于补体受体，则以其结合对象来命名，如 C1rR、C5aR 等，对 C3 片段的受体则用 CR 1～5 表示。

补体的大多数成分由肝脏实质细胞和单核-吞噬细胞合成，内皮细胞、肠道上皮细胞及肾小球细胞等也可少量合成。人血清中的补体总含量约占血清总蛋白的 5%～6%，个体血清补体水平一般不因免疫而有较大波动，只是在某些疾病状态下才有变化。

不同成分的补体分子量差别较大，电泳迁移率亦不同，多数分布于 β 区，少部分位于 α 区和 γ 区。补体多种成分均不耐热，0～10℃中活性仅可保存

3～4天，51℃35 分钟，55℃12 分钟，61℃2 分钟可被灭活。强烈振荡、酸、碱、醇、醚、氯仿、胆盐、紫外线或 α 粒子照射等因素均可使补体失活。体外实验时常用动物血清作为补体的来源，豚鼠血清中补体各成分含量最为丰富，溶血能力最强，又易获得，因此，最常用于溶血性实验。

补体系统主要通过三类功能成分表达生物学活性和自我调控反应，即参与补体级联反应的各种固有成分、补体调控分子及补体受体等。生理情况下，循环中的补体成分均以非活化的酶前体形式存在，在遇相应激活物质刺激后，补体系统可通过传统途径、旁路途径和凝集素途径活化，在活化的级联反应中发挥各种生物学效应。补体的主要作用方式有：

1. 溶解靶细胞，包括血细胞、肿瘤细胞、细菌等。

2. 介导调理吞噬，补体裂解片段被覆于细胞或外来颗粒性抗原上，与吞噬细胞表面的相应受体结合，促进吞噬作用。

3. 调节炎症和免疫反应，如趋化炎性细胞、免疫粘附等作用。

4. 有利于调节细胞的生物学活性，补体结合至细胞可引起细胞活化乃至分化，结合抗原则有利于其与细胞上的相应抗原受体结合，呈递抗原。补体的这些作用在体内具有两面性，既参与免疫防御、免疫调控等正常免疫反应，也参与对组织的免疫病理损伤。补体成分如 C2、C4、C3、C6、B 因子等存在着高度的遗传多态性，且几乎所有的补体蛋白都可能发生遗传缺陷。因此检测体内补体成分的活性及含量，了解补体系统的变化状况，有助于对临床多种疾病的诊断、鉴别、治疗及发病机制的研究。

检测补体的方法主要包括对补体活性的测定和补体成分的测定。活性测定可反映补体功能，通常用 50%溶血法测定血清中补体经传统途径活化和旁路激活途径活化的程度。补体各成分的定量测定多用免疫化学法，如免疫比浊法、琼脂单向扩散实验、火箭电泳法等。亦可用化学发光法或间接免疫荧光法和流式细胞仪检测 C1 酯酶抑制物活性（C1-INH）或细胞膜补体受体等。

（一）血清总补体溶血活性（CH_{50}）测定

［原理］

特异性抗体（溶血素）致敏羊红细胞（SRBC）形成的复合物，能激活血清中的补体 C1，引起补体成分的级联反应，使 SRBC 发生溶血，根据溶血程度可判定补体总活性。当红细胞和溶血素量一定时，在限定的反应时间内，溶血程度与补体量及活性呈正相关，但非直线关系而是 S 形曲线关系，在接近 50%溶血（CH_{50}）时，两者之间近似直线关系，故以 50%溶血作为最敏感的判定终点，称为 50%溶血实验，即 CH_{50}（50% complement hemolysis）。以引起 50%溶血所需的最小补体量为一个 CH_{50}单位，可计算出待测血清中总的补

体溶血活性。此法检测的溶血活性与补体多个成分的含量和功能有关，C1～C8（此实验中，溶解绵羊红细胞不需要 C9 参与）任何一个成分缺陷均可使 CH_{50}降低。但单个补体成分的含量波动可能对实验结果影响不明显。

［参考值］

补体的 CH_{50}正常参考值应根据各实验室应用的方法检测一定数量健康人后确定。一般正常人为 170±70U/ml。

［临床意义］

CH_{50}异常可见于临床多种疾病。通常以活性下降临床意义较大。CH_{50}降低且伴补体 C4 含量下降、C3 水平正常或下降时，多反映补体以传统途径活化异常为主的疾病，如系统性红斑狼疮、血清病、遗传性血管神经性水肿、弥漫性血管内凝血、获得性 C1-INH 缺陷、急性病毒性肝炎早期、冷球蛋白血症、皮肤血管炎、疟疾、登革热、自身免疫性溶血性贫血等。若 CH_{50}降低，C3 亦降低，C4 正常，则该疾病的补体活化以旁路途径为主，如膜增殖性肾小球肾炎、急性肾小球肾炎、内毒素性休克等。CH_{50}增高常见于风湿热、Reiter 综合征、银屑病关节炎、皮肌炎、结节性动脉周围炎、全身性硬化症（PSS）、贝赫切特病、结节病、盘状红斑狼疮以及急、慢性感染等。

（二）补体旁路途径溶血活性的测定（AP_{50}）

［原理］

利用未致敏的家兔红细胞（RE）具有激活 B 因子引起补体旁路途径（AP）活化的特点。实验先用乙二醇双（α-氨基乙基）醚四乙酸（ethylene glycol bis-amino tetracetate，EGTA）螯合待检样本中的 Ca^{2+}，封闭 C1 的作用，避免补体经传统途径活化。RE 激活 B 因子引起 AP 活化，导致兔红细胞损伤而发生溶血。此实验是反映参与补体旁路途径活化的成分，即补体 C3、B 因子、D 因子、P 因子以及 C5～C9 活性的一项较简便的方法。

与 CH_{50}方法类似，结果以引起 50%溶血所需的最小补体量为一个 AP_{50}单位，计算出待测血清中补体旁路途径溶血活性。

［参考值］

22±3.0U/ml。

［临床意义］

AP_{50}测定对固有免疫功能及自身免疫性病理损伤的观察与分析具有重要意义。某些类型的慢性肾炎、肾病综合征、肿瘤、感染、某些自身免疫病等时 AP_{50}活性可显著增高，而肝硬化、慢性活动性肝炎、急性肾炎则明显降低。

（三）补体成分测定

人类补体系统中补体蛋白的遗传缺陷或获得性缺陷，与临床多种疾病密切

相关。根据检测方法和临床应用，世界卫生组织（WHO）和国际免疫学会报告，30 多种补体成分中通常需检测的主要是 C3、C4、C1q、B 因子和 C1 酯酶抑制物等成分。

［免疫学检验］

1. C3 测定　C3 是一种 β_1 球蛋白，沉降系数 9.5s，相对分子质量为 180 000，含糖量约占 2.2%，是补体系统中血清含量最丰富的成分，在补体活化的传统途径、旁路途径和凝集素途径中均起关键作用。C3 主要由肝实质细胞合成并分泌，少量由吞噬细胞和单核细胞合成。完整的 C3 分子不具有生物学活性，由 α 和 β 两条多肽链构成。α 链含 998 个氨基酸残基，分子量 110 000；β 链含 669 个氨基酸残基，分子量 70 000。两条链由多个二硫键连接，呈平行排列。

C3 可被不同的补体活化途径形成的 C3 转化酶作用而活化。传统途径（CP）的 C3 转化酶 C $\overline{4b2a}$（C42），是由抗原-抗体复合物激活的 C1 酯酶作用于 C4、C2 形成。旁路途径（A P）的 C3 转化酶有两种，起初由激活物结合 C3b（C3 生理性少量自发裂解或在传统途径中裂解产生的 C3b）开始，当 C3b 与 B 因子（Bf）结合并被活化的 D 因子（Df）分解 Bf 成 Bb、Ba 时，由此形成初期的 C3 转化酶 C $\overline{3bBb}$。这种转化酶不稳定，当与 P 因子结合后，可形成较稳定的具有正反馈环扩大作用的 C3 转化酶 C $\overline{3bBbp}$，这种转化酶能裂解 C3 产生更多的 C3b。凝集素途径（LP，参见甘露糖结合凝集素）中，甘露糖结合凝集素（MBL）活化 C3 与 MBL 相关丝氨酸蛋白酶（MASPs）1、2 和 3 组成的功能性复合物作用有关。MASP2 具有补体经典途径的 C1 酯酶活性，对裂解 C4 起作用。甘露糖配体-MBL- MASP-2 构成的复合物（无需 MASP-1）能活化 C4、C2，形成 C3 转化酶（C $\overline{4b2a}$）；而有 MASP-1 连接的复合物，则可直接裂解 C3，产生 C3b 片段激活补体替代途径。C3 经活化后，多种功能即由各种裂解的片段表现出来。

测定 C3 含量的常用方法主要有单向免疫扩散法和免疫比浊法，亦可用 ELISA 法。免疫比浊法又分散射比浊法和透射比浊法两大类，散射比浊法又分终点法（end-point assay）和速率法（rate assay）两种。

人血清中 C3 正常参考值为 1.14±0.54g/L。

2. C4 测定　C4 是参与补体传统途径活化的成分，相对分子质量约为 200 000。C4 分子由三条肽链以二硫键相连，相对分子质量分别为 93 000（α 链），78 000（β 链）和 33 000（γ 链）。C4 由肝细胞和吞噬细胞合成，先呈单链结构合成，后经两次细胞内蛋白酶解形成含三个亚基的分泌型 C4（$C4^S$），分泌于细胞外，经再一次酶解后成为血浆型 C4（$C4^P$）。$C4^S$ 和 $C4^P$ 溶血活性

相等，易被调节酶 C4 结合蛋白（C4bp）和因子 I，即 C3b 灭活剂 C3b（INA）降解。传统途径活化时，C4 被 C1s 在 α 链处裂解出一小片段 C4a 和较大片段 C4b（含 β 链、γ 链和大部分 α 链）。C4a 为一弱过敏毒素，对 pH、热、高浓度盐有较大耐受性。C4b 的大部分以无活性形式游离于液相中，小部分亚稳肽 C4b 则以共价键与靶细胞膜受体结合，并与活化的 C2a 结合形成 C3 转化酶（$C\overline{4b2a}$），继续补体的级联反应。C4 在激活补体，促进吞噬．防止免疫复合物沉淀和中和病毒等方面发挥作用。

测定 C4 含量的方法同 C3 含量的测定。人血清中 C4 正常参考值为 0.4±0.2g/L。

3. C1q 测定　C1q 是补体 C1 的组成成分，电泳位置在 γ 区带。循环中的 C1 为大分子蛋白复合体，由 5 个亚单位组成，即 1 个 C1q，2 个 C1r 和 2 个 C1s。其中 C1q 起识别作用，C1r 和 C1s 具备催化功能。

C1q 相对分子质量为 410 000，有 18 条多肽链借二硫键相连接．每 3 条多肽链为一个亚单位，构成螺旋状，形成似 6 个球形体组成的花冠样结构。C1q 的头部能够直接结合 Ig 的 Fc 段，与 IgG 和 IgM 的结合分别在 CH2 和 CH3 区。C1q 启动补体系统活化时必须结合两个以上的 Fc，因此，不同类 Ig 抗体导致的补体活化程度有所差别。IgM 类抗体同时有 5 个 Fc 段可供 C1q 结合，一个与抗原结合的 IgM 分子即可启动补体的传统活化途径。而 IgG 类抗体浓度需达到 IgM 的 10^2～10^3 倍，才能引起 C1q 作用。

测定 C1q 含量，可用单向免疫扩散法、免疫比浊法和 ELISA 法等。人血清中 C1q 含量 5 岁前随年龄递增，5 岁后达成人水平，约为 0.15g/L。

4. B 因子测定　B 因子是参与补体旁路途径活化的主要成分，是一种不耐热的 β 球蛋白，50℃30 分钟即可失活。在旁路活化途径中，B 因子被 D 因子裂解成相对分子质量为 60 000 和 33 000 的 Bb 和 Ba 2 个片段，Bb 与 C3b 结合构成旁路途径的 C3 转化酶和 C5 转化酶。Ba 可抑制 B 细胞增殖。

检测 B 因子的含量可采用单向免疫扩散法、免疫比浊法、火箭免疫电泳法等方法。正常人血清中 B 因子含量参考值为 0.20g/L。

5. C1 酯酶抑制剂测定　C1 酯酶抑制剂，又称 C1 抑制物（C1-INH），是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员。相对分子质量为 110 000，电泳位置在 α 区带。生理情况下，C1-INH 与 C1r 结合，能防止 C1 的自发激活。当 C1q 识别了抗原抗体结合形成的复合物而发生变构后，C1r 与 C1-INH 解离、活化，激活 C1S，进而形成 C1 酯酶，启动补体传统途径活化。此过程中，C1-INH 可被 C1r 和 C1S 裂解并与之结合形成共价酯键，组成复合结构，导致 C1r 和 C1S 失活。C1-INH 即以此方式控制 C1 的活化水平。C1-INH 还在凝血、激肽一

纤溶系统中起调节作用。

检测 C1-INH 可采用免疫比浊法或化学发光等方法。

[临床意义]

补体成分异常分先天性和获得性两类。

1. 补体遗传缺陷　大多数补体成分均可能发生遗传缺陷。C1-INH 缺陷可导致遗传性血管神经性水肿。C1～C9 及其他成分的缺陷与自身免疫病及反复感染等疾病有关。

2. 获得性补体异常

(1) 高补体血症：多数补体成分尤其是 C3、C4、B 因子和 C1-INH 等在机体急性期反应时可增高。急性炎症、组织损伤如风湿热急性期、结节性动脉周围炎、皮肌炎、心肌梗死、伤寒、痛风、Reiter's 综合征和各种类型的多关节炎，非感染性慢性炎症状态如类风湿关节炎以及妊娠时，补体成分含量可高于正常时的 2～3 倍。

(2) 低补体血症：主要见于免疫复合物导致的补体消耗增多，如系统性红斑狼疮、药物性红斑狼疮、Ⅰ型、Ⅱ型膜增殖性肾小球肾炎、感染后肾小球肾炎（GN）、慢性活动性肾小球肾炎、荨麻疹性脉管炎综合征、类风湿关节炎、冷球蛋白血症、遗传性免疫球蛋白缺乏、Graves 病（突眼性甲状腺肿）、甲状腺炎、肝脏疾病、回-空肠吻合术后、恶性肿瘤化疗、AIDS、多发性骨髓瘤等。此外，急、慢性肝炎，肝硬化或肝癌、严重营养不良等引起的补体合成不足和大出血、大面积烧伤及肾病综合征等导致的补体大量丢失，也是低补体血症的主要原因。

三、甘露糖结合凝集素

[概述]

甘露糖结合凝集素（mannose-binding lectin，MBL），又称甘露糖结合蛋白（mannose-binding protein，MBP），是 1978 年由 Kawasaki 等首次从兔肝中分离得到的一种蛋白质，因其与酵母菌细胞壁甘露糖残基有较强的亲和力而命名。

MBL 由肝脏合成并分泌，属于 C 型（Ca^{2+}依赖型）凝集素家族成员，广泛存在于多种哺乳动物血液循环中。人类 MBL 存在两种亚型，即血清型（SMBL）和肝脏型（LMBL），它们的氨基酸序列、蛋白质结构以及免疫学反应相同，但 SMBL 所含肽链数（9～18 条）常多于 LMBL（3～9 条）。通常提及的 MBL 即指 SMBL。

MBL 的完整蛋白质分子是多个亚单位（2～6 个）的聚合体，每一亚单位

由 3 条完全相同的肽链组成，各肽链含 4 个功能区，即富含半胱氨酸的 N 末端区、胶原样区（collagen-like region，CLR）、颈区和 C 末端 C 型糖识别域（carbohydrate-recognition domain，CRD）。肽链的 N 末端以二硫键连接，相互缠绕形成胶原样三股螺旋结构，C 末端则各自卷曲成球形，共同构成花冠状。二聚体和三聚体无生物学活性，激活补体至少需要四聚体。六聚体的 MBL 约占总血清 MBL 含量的 20%，分子结构与补体 C1q 极其相似，具有高效的生物学活性。人 MBL 基因位于 10 号染色体长臂上（10q11.2-q21），含 4 个外显子，外显子 1 编码 N 末端区及部分 CLR（7 个重复的 Gly-x-y），外显子 2 编码其余部分 CLR（12 个重复序列的 Gly-x-y），外显子 3 编码颈区，外显子 4 编码 CRD。

MBL 是宿主体内非酶非抗体的天然第一线抗感染免疫分子，属于急性期蛋白。其主要的生物学功能包括：

1. 当机体感染病原体，特异性抗体尚未形成时，MBL 即可通过 CRD 选择性地与存在于多种病原菌如细菌（金黄色葡萄球菌、β-溶血性 A 族链球菌、大肠埃希菌、克雷伯菌属等），病毒（HIV-1、流感病毒 A 等）及真菌（多种假丝酵母菌、曲真菌等）表面的糖成分（甘露糖、N-乙酰甘露糖胺、N-乙酰葡糖胺等）结合，通过与血清中 MBL 相关丝氨酸蛋白酶（MASPs）1、2 和 3 组成的功能性复合物作用，启动凝集素途径，激活补体系统（MASP-2 具有补体经典途径的 C1 酯酶活性，可裂解 C4、C2 使形成 C3 转化酶 $C\overline{4b2a}$），间接调理吞噬细胞吞噬功能，清除异物和免疫复合物；

2. 与单核-吞噬细胞表面的相关受体（C1q 受体）结合，直接调理吞噬作用。

3. 抑制、中和病毒，阻碍病毒进入易感细胞。

通常哺乳类宿主的 MBL 仅识别外源性糖配体，而对内源性细胞表面糖结构不起反应。正常生理状况下，组织细胞表面覆盖的糖蛋白一般为唾液酸低聚寡糖，不被 MBL 识别，但某些被病毒感染修饰的细胞或肿瘤细胞，如神经胶质瘤、结肠癌（SW116 株）细胞在生长过程中表面的寡糖类紊乱，表达高甘露糖结构，进而成为 MBL 结合的配体。

MBL 在固有免疫中有重要作用。MBL 缺损个体易患某些感染性疾病和自身免疫病。

［免疫学检验］

检测血清中 MBL 主要采用 ELISA 法。即将甘露聚糖包被于酶联反应板上，待测样本中的 MBL 与之结合，加入生物素化的抗 MBL 抗体，此抗体与结合在甘露聚糖上的 MBL 结合形成免疫复合物，未结合的成分被洗去。再加

辣根过氧化物酶标记的链霉亲合素与生物素化的抗 MBL 抗体结合，洗去多余物质，加酶底物/色原显色。检样中 MBL 的浓度与吸光度（*A*）值成正比。

血清 MBL 浓度个体差异较大，范围约 40～3 500μg/ml。不同种族和地区的人群报道不一。各实验室应根据各自实验室条件和采用的试剂检测一定数量的健康人确定参考值。

［临床意义］

血清中 MBL 浓度主要与 MBL 基因多态性有关。某些反复感染（尤其是儿童）、自身免疫病如 SLE、RA 及肾脏疾病等患者，MBL 水平低下。

血清 MBL 浓度升高见于细菌感染、创伤、手术后等急性期反应，一般增高幅度为正常状态时的 2～3 倍。

由于 MBL 血清浓度个体差异较大，因此，同一患者最好在不同病期连续测定，前后对照。

四、溶　菌　酶

［概述］

溶菌酶（lysozyme）1922 年由 Fleming 于鸡卵清中分离，是由 129 个氨基酸残基构成的一种碱性蛋白质，相对分子质量约 15 000，等电点约为 pH 11.0，广泛分布于各种组织和体液中。人血清中溶菌酶主要来自中性粒细胞、单核细胞和吞噬细胞的溶酶体。泪液中溶菌酶含量约为血清含量的 100～150 倍。肾脏近曲小管上皮细胞溶酶体内也含有高浓度溶菌酶。正常人尿液中溶菌酶含量极低，可能是因为近曲小管对溶菌酶有强大的再吸收作用。

溶菌酶是一种糖分解酶（saccharolytic enzyme），可特异性的作用于革兰阳性细菌细胞壁肽聚糖分子的胞壁酸-β（1-4）-N-乙酰（基）-葡糖胺键［muramic acid-β（1-4）-N-acetyl-glucosamine linkage］，也能增强补体对革兰阴性细菌的作用。革兰染色阳性的溶壁微球菌（*Micrococcus lysodeikticus*）对溶菌酶的作用特别敏感。

［免疫学检验］

测定溶菌酶的方法主要有溶菌环法、透射比浊法、ELISA 法等。

［临床意义］

1. 急性或复发性尿路感染患儿，尿溶菌酶＞1.5mg/L；细菌性脑膜炎患儿脑脊液中溶菌酶＞1.5mg/L；病毒性或结核性脑膜炎、脑肿瘤患儿的脑脊液溶菌酶不升高。

2. 同种异体肾移植后发生排异反应、肾小管炎症或抗生素诱发的肾小管损伤，尿溶菌酶均可显著升高。

3. 髓性或单核细胞性白血病患者血清和尿溶菌酶显著升高，淋巴细胞性白血病则正常或降低。

五、炎症反应物质

（一）C反应蛋白

［概述］

1930年Tillet和Francis首次在急性大叶性肺炎患者的血清中发现一种能在Ca^{2+}存在时与肺炎球菌细胞壁中的荚膜多糖（C多糖）形成复合物的物质，命名为C反应素。1941年Abernethy、Avery和Macleod、Avery等测知它是一种蛋白质，故称为C反应蛋白（C reactive protein，CRP）。CRP可与许多细菌、真菌、寄生虫的细胞壁磷酰胆碱和人细胞膜磷酰胆碱结合，还能与聚阴离子（DNA、肝素、硫酸葡聚糖），聚阳离子（组蛋白、白细胞阳离子蛋白、鱼精蛋白、髓磷脂碱性蛋白）等结合，与聚阴离子的结合依赖钙，与聚阳离子结合不依赖钙。

CRP是机体的一种重要急性期蛋白，由肝脏合成并释放入血。由相对分子质量23 017的5个亚单位组成，每个亚单位有206个氨基酸残基。完整的CRP是一种环形结构的五聚体，这种特征性的结构使其归类于五聚素（pentraxins，一组具有免疫防御特性的钙结合蛋白）家族。在急性期反应时肝细胞在IL-6等细胞因子诱导下大量合成CRP。正常情况下每天合成1～10mg，急性炎症时每天可合成1g。外科损伤患者血中CRP水平8～10小时可增加1倍。循环中CRP半衰期为19小时。CRP的主要生物学功能是通过与配体（凋亡与坏死的细胞，或入侵的细菌、真菌、寄生虫等的磷酰胆碱）结合，激活补体和单核-吞噬细胞系统，将载有配体的病理物质或病原体清除。

［免疫学检验］

目前CRP常用测定的方法有ELISA法，速率散射比浊法、胶乳增强法和透射比浊法。

［参考值］

正常人血清CRP浓度≤8mg/L。

［临床意义］

1. 用于器质性疾病筛查　如细菌感染引起的急、慢性炎症，自身免疫病或免疫复合物病；组织坏死和恶性肿瘤。

2. 并发感染的鉴别　CRP＞100mg/L为细菌感染，病毒感染≤50mg/L，革兰阴性菌感染可高达500mg/L。

3. 评价疾病活动性和疗效监控　CRP 10～50mg/L表示轻度炎症（膀胱

炎、支气管炎、脓肿）、手术、创伤、心肌梗死、深静脉血栓、非活动风湿病、恶性肿瘤、病毒感染；CRP≥100mg/L 提示为较严重的细菌感染，治疗需静脉注射抗生素；治疗过程中 CRP 仍维持高水平提示治疗无效。

4. 器官移植术后监测　血清 CRP 浓度持续升高提示发生排异反应。

（二）血清淀粉样蛋白 A

［概述］

血清淀粉样蛋白 A（serum amyloid A，SAA）是一种急性期蛋白，属于载脂蛋白家族中的异质类蛋白质，相对分子质量约 12 000，功能亦与高密度脂蛋白中第三成分（HDL_3）相关。在急性期反应中，经 IL-1、IL-6 和 TNF 刺激，SAA 在肝脏中由被激活的吞噬细胞和成纤维细胞合成。合成后的 SAA 与 HDL、LDL 和 VLDL 结合，尤其是与 HDL_3 结合。急性期反应时，血浆 SAA 浓度可上升 100～1 000 倍。SAA 的生理学意义仍不清楚，但吞噬细胞对 HDL-SAA 结合物的亲和力是对单独 HDL 亲和力的 2～3 倍。

［免疫学检验］

测定人血清中 SAA 可采用 ELISA 法，放射免疫法和免疫比浊法等。

［临床意义］

血清或血浆中的 SAA 浓度是反映感染性疾病早期炎症的敏感指标，不可逆移植排斥反应、转移性恶性肿瘤患者血清 SAA 增高幅度显著高于可逆性移植排斥反应和肿瘤未转移患者。类风湿关节炎、结核病或麻风病患者的 SAA 浓度呈缓慢升高，可能与合成 AA-淀粉纤维、引起组织或器官继发性的淀粉样蛋白变性有关，对此有诊断价值。

（三）脂多糖结合蛋白（LBP）

［概述］

脂多糖结合蛋白（LPS binding protein，LBP）是以低水平存在于正常人血清中的急性期蛋白，主要由肝脏合成，炎症反应中水平升高。相对分子质量 60 000。LBP 主要与细菌脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）的脂质 A（lipid A）结合。LPS 是由脂质核心（脂质 A）和多糖侧链组成的复合分子，是革兰阴性杆菌特别是肠道杆菌的菌体抗原（O 抗原）的组成成分。脂质 A 嵌在细菌外膜中，多糖突出在细胞外。当 LPS 结合蛋白与 LPS 的脂质 A 结合后，可与单核细胞和吞噬细胞上的相应受体 CD14 结合，LPS 从而可诱导单核-吞噬细胞产生 TNF-α 和其他细胞因子。

LBP 不耐热，在 50℃时活性较稳定，56℃30 分钟可丧失 70%生物学活性，59℃则完全失活。生理条件下血浆中 LBP 含量极微，当肝脏受细菌内毒素（LPS）刺激后，LBP 分泌迅速增高，血浆中 LBP 浓度可升高达 100 倍以

上。炎症刺激后肾、心、脾等组织中亦有 LBP 表达。

[临床意义]

LBP 浓度升高见于急性细菌感染。由于革兰阴性细菌多含有大量的 LPS，因此，此类细菌引起的感染，特别是败血症患者的 LBP 可显著升高。创伤、病毒性肝炎时 LBP 浓度也升高。

（四）选择素

[概述]

选择素（selectin）属于细胞粘附分子中的一个家族，目前已发现三个成员：P-选择素、E-选择素和 L-选择素，分别表达于血小板、内皮细胞和白细胞。选择素分子均为Ⅰ型跨膜糖蛋白，可分为胞膜外区、穿膜区和胞浆区。P-、E-及 L-选择素各成员的胞膜外部分有较高的同源性，结构类似，均由三个功能区构成：

1. 外侧氨基端（约 120 个氨基酸残基） 均为钙离子依赖的外源凝集素功能区，可以结合碳水化合物基团，是选择素分子的配体结合部位；

2. 紧邻外源凝集素功能区的表皮生长因子样功能区（EGF 样区） 约 35 个氨基酸残基，不直接与配体结合，但参与选择素分子的构型；

3. 靠近膜部分 是数个由 60 个氨基酸残基构成的补体结合蛋白的重复序列。各种选择素分子的穿膜区和胞浆区没有同源性。胞浆区与细胞内骨架相连。P-选择素主要在炎症早期介导白细胞、内皮细胞与血小板的起始黏附；L-选择素介导白细胞移向炎症区、淋巴细胞归巢和再循环；E-选择素在白细胞与内皮细胞黏附的起始阶段起介导作用。

[免疫学检验]

选择素检测常用引入生物素-链霉亲合素的 ELISA 法，用商品试剂盒。

[参考值]

P-选择素 8～38μg/L；E-选择素 17～31μg/L；L 选择素尚无参考值。

[临床意义]

选择素是炎症早期最早起作用的粘附分子，也与肿瘤细胞浸润及转移相关。血清中选择素水平可反映出体内血管内皮细胞的活化状态，感染、肿瘤、糖尿病等多种疾病患者体内水平可明显增高。

（五）炎症性细胞因子

与炎症相关的细胞因子如 TNF-α、IFN、IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 等测定参看第五章细胞免疫功能分析。

第四章　免疫球蛋白

免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）是指具有抗体活性或化学结构与抗体相似的一类球蛋白，是体液免疫反应的主要反应物质。抗体是能与相应抗原发生特异性结合并具有多种免疫功能的球蛋白。抗体都是免疫球蛋白，但 Ig 并非都具有抗体活性。Ig 由浆细胞产生，广泛存在于血液、组织液和外分泌液中，约占血浆蛋白总量的 20%。也可以膜免疫球蛋白（SmIg）的形式存在于 B 细胞表面。

Ig 分子由四条肽链组成，两条相同的长链称为重链（heavy chain，H），由 450 个氨基酸残基组成，分子量约 51 000～72 500；两条相同的短链称为轻链（light chain，L）由约 214 个氨基酸组成，分子量约 22 500。四条肽链通过链内和链间二硫键（-S・S-）连接在一起。Ig 分子肽链的氨基端（N 端），在 L 链 1/2 和 H 链 1/4（α、γ、δ）或 1/5（μ、ε）处，氨基酸的种类和顺序随抗体特异性不同而变化，称为可变区（variable region，V 区）；肽链其余部分的氨基酸种类和排列顺序比较稳定，称为恒定区（constant region，C 区）。V 区与 C 区的分界线在 114 位氨基酸，其前的 N 端为 V 区，115 位以后的羧基端（C 端）为 C 区。H 链和 L 链的 V 区和 C 区分别简写为 V_H、C_H 和 V_L、C_L。V_H 和 V_L 中某些部位的氨基酸变化更大，称为高变区（hypervariable region，HR）。H 链和 L 链的 V 区是 Ig 分子与抗原的结合区，并决定抗体同抗原结合的特异性。H 链有 4 个功能区，V_H、C_H1、C_H2 和 C_H3，IgM 及 IgE 的重链恒定区则多一个 C_H4 功能区。C_H1 区为 Ig 同种异型遗传标记部位。在 C_H1 与 C_H2 之间的区域称为铰链区，含较多的脯氨酸，短而柔软。当 Ig 与相应抗原结合后，铰链区构型改变，暴露出 C_H2 区的补体结合位点，血清中补体 C1q 与其结合进而激活补体系统。L 链有 2 个功能区，V_L 和 C_L。V_L 中的高变区是与抗原结合的部位，C_L 具有 Ig 同种异型遗传标记。

完整的 lg 分子被蛋白酶水解时可裂解为不同的片段。以 IgG 分子为例，当用木瓜蛋白酶（papain）消化时，IgG 分子从铰链区的氨基端断裂，形成 3 个片段，即两个 Fab 段和一个 Fc 段。Fab 段分子量为 45 000，具有与抗原结合的活性，但只有一个抗原结合位点（单价），故不能与抗原反应形成可见的沉淀和凝集现象。Fc 是指可结晶的片段，相对分子质量为 50 000，不具有抗

体活性，但 Ig 分子的很多生物学活性如激活补体、结合细胞以及通过胎盘等与之有关。当用胃蛋白酶（pepsin）消化时，IgG 分子从铰链区的羧基端断裂，形成 2 个片段，即大的 F（ab′)$_2$ 段和小的 pFc′段。F（ab′)$_2$ 是两个 Fab 加上重链的铰链区，由二硫键相连，相对分子质量为 100 000，具有两个抗原结合位点（双价），因而能与抗原反应形成可见的沉淀和凝集现象。pFc′段为无活性的小分子肽。

目前已发现人体内有 5 类免疫球蛋白，即 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE，其重链分别为 γ、α、μ、δ 和 ε，各类 Ig 的轻链有 κ（kappa）和 λ（lambda）两型。每个 Ig 分子的两条轻链都同型。

第一节 IgG、IgA、IgM 测定

［概述］

IgG 由浆细胞合成，分子量 150 000，有 IgG_1～IgG_4 4 个亚类，以单体形式存在于血清和其他体液中，是唯一能通过胎盘的抗体，婴儿出生后 3 个月开始合成。IgG 在正常人血清中含量最多，占血清 Ig 总量的 3/4，达 10～16g/L，半衰期 7～21 天，是体液中最重要的抗病原微生物的抗体（再次免疫应答抗体），也是自身免疫病时自身抗体的主要类别。

IgA 相对分子质量 160 000，有 IgA_1、IgA_2 两个亚类，分血清型和分泌型两种，半衰期为 6 天。血清型 IgA 由肠系膜淋巴组织中的浆细胞产生，多数以单体形式存在，含量 2～5g/L，占血清总 Ig 的 10%～15%，具有中和毒素、调理吞噬的作用。分泌型 IgA 由两个单体、一个 J 链（是一种连接单体 Ig 的小分子酸性糖肽，相对分子质量 15 000）和一个分泌片（是一种相对分子质量 70 000 的糖蛋白，由上皮细胞合成。二聚体 IgA 通过黏膜与之结合后由细胞分泌）组成，主要分布于各种黏膜表面和唾液、初乳、泪液、汗液、鼻腔分泌液、支气管中分泌液及消化道分泌液中，参与机体的黏膜局部抗感染免疫反应。IgA 不能通过胎盘屏障，初生婴儿只能从母乳中获得 IgA，出生后4～6个月开始自身合成，1 岁后合成水平可达成人的 25%，16 岁达成人水平。

IgM 分子量最大，971 000，由 5 个单体借一个 J 链和若干二硫键连接形成 5 聚体，又称巨球蛋白，有 IgM_1、IgM_2 两个亚类，主要分布于血液中，血清含量为 1～1.25g/L，占血清 Ig 总量的 1/10，半衰期 5 天。IgM 是个体发育中最早合成的抗体，孕 20 周起，胎儿自身即能合成，出生后，IgM 合成增加，8 岁后达成人水平。机体遭受感染后，IgM 型抗体最早产生（初次免疫应答反

应的抗体），因此，IgM 的出现与近期感染有关。新生儿脐带血中 IgM 含量增高时，提示胎儿有宫内感染。IgM 是高效能的抗微生物抗体，主要功能是凝集病原体和激活补体经典途径。

［免疫学检验］

测定血清 IgG、IgA、IgM 含量均可用单向环状免疫扩散法和免疫比浊法（透射比浊法、速率或终点散射比浊法）。

［参考值］

年龄与血中 Ig 含量有一定关系，新生儿可获得由母体通过胎盘转移来的 IgG，故血清含量较高，近于成人水平。婴幼儿由于体液免疫功能尚不成熟，免疫球蛋白含量较成人低。各年龄段参考值见表 4-1。

表 4-1 各年龄组 IgG、IgA、IgM 含量的参考值（g/L）

年龄	IgG	IgA	IgM
新生儿	9.70±4.00	0.008±0.005	0.13±0.07
4 个月	5.20±1.98	0.24±0.11	0.57±0.34
7 个月	5.40±2.34	0.23±0.18	0.56±0.32
1 岁	6.40±2.80	0.32±0.24	0.82±0.44
3 岁	7.20±3.38	0.64±0.50	0.84±0.44
7 岁	7.80±2.80	0.86±0.52	0.94±0.50
12 岁	10.20±3.84	1.21±0.58	0.85±0.56
15 岁	9.80±3.44	1.39±0.90	0.94±0.52
18 岁	10.30±3.84	1.49±0.96	0.93±0.52
成人	12.87±1.35	2.35±0.34	1.08±0.24

［临床意义］

1. 低 γ 球蛋白血症　血清 IgG、IgA、IgM 降低有先天性和获得性两类。先天性低 Ig 血症主要见于体液免疫缺损和联合免疫缺陷病。一种情况是 Ig 全缺，如先天性性连丙种球蛋白缺乏血症（X-linked agammaglobulinemia，XLA），血中 IgG<1g/L，IgA 与 IgM 含量也明显降低。另一种情况是三种 Ig 中缺一或两种。最多见的是缺乏 IgA，患者易患呼吸道反复感染；缺乏 IgG 易患化脓性感染；缺乏 IgM 易患革兰染色阴性细菌引起的败血症。获得性低 Ig 血症血清中 IgG<5g/L，引起的原因较多，如有大量蛋白丢失的疾病（剥脱性皮炎，肠淋巴管扩张症，肾病综合征等），淋巴系统肿瘤（如淋巴肉瘤、霍奇金病），中毒性骨髓疾病等。许多药物如青霉胺、苯妥英钠、金制剂以及免疫抑制剂等也可致 Ig 降低。

2. 多克隆 γ 球蛋白升高　血清免疫球蛋白（IgG、IgA、IgM）增高常见

于各种慢性细菌感染，如慢性骨髓炎、慢性肺脓肿、感染性心内膜炎时 IgG、IgA、IgM 均可增高。子宫内感染时，脐血或生后 2 日的新生儿血清中 IgM 含量可＞0.2g/L 或＞0.3g/L。在多种自身免疫病、肝脏疾病（慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、隐匿性肝硬化）、淋巴瘤等患者可有一种或三种 Ig 升高。结缔组织病尤其在活动期常有 IgG 升高。80%活动性 SLE 以 IgG、IgA 升高较多见。类风湿关节炎以 IgM 升高为主。IgA 肾病、过敏性紫癜肾炎 IgA 常升高。

3. 单克隆 γ 球蛋白升高　主要见于浆细胞恶性病变，包括多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症等。

第二节　IgD

［概述］

IgD 以单体形式存在于血清中，相对分子质量 175 000，血清中含量为 0.04～0.4g/L，仅占血清总 Ig 的 1%，易被酶解，半衰期 2.8 天，是成熟 B 细胞的重要表面标志。当 B 细胞上表达膜表面 IgD（SmIgD）时，受抗原刺激可被激活，故认为 SmIgD 为 B 细胞激活受体。IgD 分子结构类似于 IgG，但不能通过胎盘，也不能激活补体。循环中 IgD 无抗感染作用，功能尚不清楚，但可能与防止免疫耐受及某些超敏反应有关。

［免疫学检验］

血清中 IgD 含量很低，10%～50%正常人血清 IgD 用免疫比浊法不能测出，故可用 ELISA 双抗体夹心法测定。

［参考值］

正常人血清 IgD 含量波动范围很广，个体差异大，从 0.003g/L 至 0.4g/L 不等。

［临床意义］

IgD 增高见于 IgD 型多发性骨髓瘤。流行性出血热、过敏性哮喘、特应性皮炎患者可见 IgD 升高。怀孕末期，吸烟者中 IgD 也可出现生理性升高。

第三节　IgE（总 IgE、特异 IgE）

［概述］

IgE 又称反应素或亲细胞抗体，相对分子质量 190 000，单体，是种系进化过程中最晚出现的 Ig，正常人血清中含量很低，且个体差异较大，约 0.03～

2.0mg/L，仅占血清总 Ig 的 0.002%。半衰期 2.5 天。对热敏感，56℃30 分钟可丧失活性。IgE 主要由呼吸道、消化道黏膜固有层中的浆细胞合成，故血清 IgE 浓度并不能完全反映体内 IgE 水平。IgE 对肥大细胞及嗜碱性粒细胞具有高度亲和性，可与细胞表面的高亲和性受体 FcεRI 结合，当过敏原再次进入机体时，与致敏的肥大细胞、嗜碱性粒细胞上的 IgE 结合，引发细胞脱颗粒，释放生物活性物质，导致发生Ⅰ型变态反应（哮喘、花粉症、变性性皮炎等）。此外，IgE 还有抗寄生虫感染的作用。

［免疫学检验］

IgE 测定包括血清中总 IgE 及特异性 IgE 测定。可采用 ELISA 法、速率散射比浊法、放射免疫分析（RIA）、化学发光或电化学发光等方法。特异性 IgE 测定时，检测系统中需引入特异性变应原。

［参考值］

正常人<150IU/ml（ELISA 法）。

［临床意义］

IgE 升高常见于变态反应性疾病（如过敏性鼻炎、外源性哮喘、花粉症、变应性皮炎、慢性荨麻疹）、寄生虫感染以及 IgE 型多发性骨髓瘤以及 AIDS、非霍奇金淋巴瘤、高 IgE 综合征（Job 综合征）患者。特异性 IgE 升高表明个体对该特异性 IgE 针对的变应原过敏。

第四节 游离轻链

［概述］

免疫球蛋白（Ig）轻链分为 κ（Kappa）、λ（lambda）2 个型别。κ 只有 1 型，λ 则有 λ_1、λ_2、λ_3、λ_6 4 个型。每个 Ig 分子上只有一个型别的轻链，而不可能是 κλ 或 $\lambda_x\lambda_y$。人类 κ 与 λ 的比例为 6∶4。轻链是能自由通过肾小球基底膜的小分子蛋白，在肾小管被重吸收，回到血循环中。因此正常人尿中只有少量轻链存在。当代谢失调和多发性骨髓瘤时，血中出现大量游离轻链（free light chains，FLC），并由尿中排出，即 Bence Jones protein（BJP）。

［免疫学检验］

免疫比浊法测定血清游离轻链。参看免疫比浊技术。最常用速率散射比浊法。

［参考值］

血清 κ 型游离轻链 3～19mg/L；λ 型游离轻链 6～26mg/L。κ/λ 比值为 0.26～1.65。

[临床意义]

对单克隆性γ球蛋白增多症（monoclonal gammopathies，MGP）的敏感性为88%～98%；对分泌性骨髓瘤（nonscretory myeloma，NSM）的敏感性为65%～70%，有助于单克隆轻链病、AL-淀粉样变的早期诊断，也可用于化疗或自身外周血干细胞移植后是否复发的监测。

第五节 循环免疫复合物

[概述]

外源性病原微生物及其释放的抗原，食物、花粉、药物及其他的环境中抗原以及机体的自身抗原（从与免疫系统隔绝处释出或被物理、化学、生物学因素修饰），均可诱导免疫系统产生特异抗体。抗体与相应抗原在循环中按不同比例结合形成相对分子质量大小不同的循环免疫复合物（CIC）。这些CIC可通过经典途径使补体活化，可激活载有Fc受体的免疫活性细胞。正常情况下这是一种清除病理抗原的生理机制，补体活化所产生的补体C3b片段可插入到CIC格子状结构中并牢固与抗体结合，抗原与抗体结合键因而断裂，大分子的CIC裂解成小分子的可溶性IC，不再能沉淀于血管壁或组织，并易被活化的吞噬细胞清除。病理情况下CIC大量持续的产生，若补体裂解CIC的活性（complex release activity of complement，CRA）下降、补体级联反应过程和（或）单核-吞噬细胞功能缺陷，均可使循环中的CIC不能被清除，并在特定条件下（涉及CIC相对分子质量大小、抗原的电荷与性质、抗原的表位数量、抗原与抗体的亲和力、与抗原结合的抗体的Ig的类别及亚类等）沉积于血管壁、肾小球基底膜、表皮组织与其他组织。在病灶局部因使补体系统活化而产生大量过敏反应产物（C3a、C5a）和通过与血小板、肥大细胞、各种粒细胞、吞噬细胞、T及B淋巴细胞上的Fc受体、补体受体结合，释放5-羟色胺等血管活性胺、溶酶体酶以及干扰各种淋巴细胞的功能等，诱导产生炎症反应，造成组织损伤。

[免疫学检验]

测定CIC的方法有抗原特异的（选择性测定由某种特定抗原如HBsAg、甲状腺球蛋白、癌胚抗原形成的CIC）和抗原非特异的（不考虑形成CIC的抗原性质）两大类。目前常规实验室大多只开展抗原非特异性的CIC的测定。测定方法多数建立于20世纪70年代，几乎没有一种方法能测出所有的、不同抗原抗体形成的CIC。因此，WHO推荐，至少采取两种方法联合检测。此处介绍两种不同实验原理的方法，可用商品试剂盒检测。

1. 聚乙二醇（PEG）沉淀比浊法　CIC 相对分子质量较大，相互结合的抗原抗体的构象发生改变，易被低浓度 PEG 自液相析出。PEG 还可抑制 CIC 解离，促进其进一步聚合成更大的凝聚物而被沉淀。利用透射比浊或散射比浊法可测出 CIC 的存在与含量。

2. ELISA 法　所测定的是能结合补体第一成分 C1q 的 IgG 类抗体与其特异抗原形成的 CIC。将 C1q 包被在聚苯乙烯反应板微孔上，使形成固相，加入待测血清后 CIC 中的 IgG（抗体）以其 Fc 段与 C1q 结合，洗涤后加入酶标记的抗人 IgG 抗体，在固相上反应生成 C1q-CIC-酶标记抗人 IgG 抗体复合物，洗去未反应物后，加入酶底物/色原溶液呈色，呈色强度反映待测血清中 CIC 水平。此法灵敏度优于 PEG 沉淀比浊法，可达 0.1μg/ml 热聚合 IgG。

［参考值］

参考试剂盒说明书。

［临床意义］

CIC 的形成是机体清除外源性的病原微生物抗原和被修饰的自身抗原的一种生理性的免疫防御和免疫稳定机制。多数感染情况下这些 CIC 短暂出现，对机体组织器官不造成损害。在某些疾病时，当 CIC 大量持续存在并沉积于血管壁、肾小球基底膜与血管外组织时，可通过活化补体以及与载有 Fc 受体和补体受体的血小板、粒细胞、肥大细胞、吞噬细胞、淋巴细胞等细胞结合，诱导血管活性胺、溶酶体酶的释放以及干扰各种淋巴细胞的功能，导致血管炎、肾小球炎、关节炎、皮炎以及其他多种组织的复杂的免疫病理损伤。这种情况最常见于感染性疾病和自身免疫性疾病。临床表现主要有血管炎、肾小球肾炎、关节炎、皮炎、脂膜炎、浆膜炎、神经炎、雷诺现象等。在风湿性疾病（系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、干燥综合征、结节性动脉周围炎、混合性结缔组织病等），病毒性感染（乙型病毒性肝炎、艾滋病、传染性单核细胞增多症等），细菌性感染（感染性心内膜炎、脑膜炎球菌感染、淋球菌播散性感染），梅毒，血吸虫病，弓形虫病，疟疾，某些肿瘤都有 CIC 的较高检出率。CIC 的消长一般可反映病情的严重性和监测治疗效果，但一次测定意义不大，世界卫生组织（WHO）建议，首次检测后数周必须复测才能证实其与疾病的相关性。ELISA（C1q 结合法）测得的 CIC 阳性率在系统性红斑狼疮为 75%～80%；类风湿关节炎为 80%～85%；血管炎为 73%～78%。PEG 沉淀比浊法与 ELISA 类似但检出率稍低，两法结果不一定完全一致。

第六节 冷球蛋白

[概述]

冷球蛋白（cryoglobulin，CG）是一种在低温4℃为不溶性，37℃时可溶解的一种病理性蛋白质，其本质是免疫球蛋白。应注意与冷纤维蛋白原区别，后者由纤维蛋白原、纤维蛋白和纤维连接蛋白组成，需用EDTA抗凝血浆测定，低于37℃时沉淀，重新加温溶解后如加入凝血酶可形成纤维蛋白凝块。冷球蛋白可分为以下几种类型：

1. 1型 又称单克隆型冷球蛋白，绝大多数为单克隆性IgM或IgG（多数为IgG_2和IgG_3亚类），单克隆性IgA或轻链冷球蛋白很少见。此型占冷球蛋白血症的5%～10%。

2. 2型 单克隆混合型冷球蛋白，由具有抗多克隆IgG抗体活性的单克隆性IgM（很少为IgA或IgG）与IgG的Fc段结合构成。此型占冷球蛋白血症的50%～65%。

3. 3型 多克隆混合型冷球蛋白，由多克隆性抗Ig抗体（绝大部分为IgM类）与其他Ig（如IgG、IgA）结合形成的免疫复合物，有时还可能含补体成分（如C3）。此型占冷球蛋白血症的30%。1型冷球蛋白和冷纤维蛋白原在4℃ 3～18小时内即可沉淀出来，而混合型冷球蛋白（2、3型）常需72小时以上。沉淀物可呈絮状、胶凝状或结晶状。

[免疫学检验]

1. 用在37℃预温的注射器抽取静脉血10ml（如需测冷纤维蛋白原，可另抽取5ml血用预温EDTA抗凝），置37℃水浴2小时。

2. 于37℃下离心分离血清或血浆（测冷纤维蛋白原时，以下操作相同）。可在套管中加入温水。

3. 用预温的毛细滴管吸取血清注入细胞比积管（Wintrobe管）至刻度10处，其余血清移至尖底离心管中，均置4℃，7天后取出离心，于4℃ 2 500 r/min离心30分钟。

4. 判定结果时观察红细胞比积管中冷沉淀物比容，作出报告；弃去尖底离心管中上层血清，用冷的9.0g/L NaCl洗沉淀物，4℃ 2 500r/ min离心，共3次。再将沉淀物用适量9.0g/L NaCl重悬，置37℃溶解后用双缩脲法测蛋白质含量。

5. 若鉴定冷沉淀物的成分，可用免疫电泳、免疫固定电泳技术，利用各种特异性抗血清（抗人全血清抗体，抗α、μ、γ重链抗体，抗κ、λ轻链抗体，

抗 C3 抗体等）予以鉴定。

6. 若鉴定冷纤维蛋白原，可在已溶解的冷沉淀物中加入凝血酶。

［参考值］

冷沉淀物比容<0.4%；冷球蛋白蛋白质含量<80mg/L；冷纤维蛋白原蛋白质含量<60mg/L。

［临床意义］

冷球蛋白因可致血管的堵塞且具有免疫复合物性质，能激活补体系统，引发炎症反应，故常引起全身性血管炎。冷球蛋白血症的临床表现有紫癜、荨麻疹和雷诺现象，有时出现严重的腿部溃疡甚至肢端坏死。70%的患者有关节痛，10%～30%患者有膜增殖性肾小球肾炎，20%患者有腹痛或神经炎。1 型冷球蛋白蛋白质浓度可>1.0g/L，多见于恶性 B 细胞疾病，如 Waldenstrŏm 巨球蛋白血症、浆细胞瘤；2 型与 3 型冷球蛋白多见于慢性丙型病毒性肝炎（50%冷球蛋白血症患者抗 HCV 抗体阳性）也见于白血病、干燥综合征等结缔组织病以及一些慢性感染患者。冷纤维蛋白原血症常与冷球蛋白血症同时存在，临床表现大致相同。

第七节　M 蛋白测定

［概述］

M 蛋白是单克隆 B 淋巴细胞或浆细胞恶性增殖产生的大量类别、亚类、型、亚型、基因型和独特型相同的均一免疫球蛋白。这种均一的蛋白质的氨基酸顺序、空间构象、电泳特性均相同。由于这种蛋白产生于单一的细胞克隆，多出现于多发性骨髓瘤（multiple myeloma）、巨球蛋白血症（macroglobulinemia）或恶性淋巴瘤（malignant lymphoma）病人的血或尿中，故称为“M 蛋白”。

M 蛋白血症大致可分为恶性的与意义不明的两类。恶性 M 蛋白血症见于：多发性骨髓瘤（包括轻链病）、Waldenstrŏm 巨球蛋白血症、重链病、7s IgM 病（Solomen-Kunkel 病）、半分子病和不完全骨髓瘤蛋白病（C 端缺陷）。意义不明的 M 蛋白血症（monoclonal gammopathy of undetermined significance，MGUS）有两种，一种是与其他恶性肿瘤（如恶性淋巴瘤）伴发者，另一种即所谓良性 M 蛋白血症。

［免疫学检验］

免疫学检查和鉴定方法对 M 蛋白血症的诊断起重要作用，通常需先定量检测血清总蛋白，约 90%的患者血清总蛋白含量升高（70%的患者>100g/

L)，约10%的患者正常甚至偏低（如轻链病）。对异常免疫球蛋白的常用检测方法如下。

1. 区带电泳 原理是利用多孔载体将血清蛋白质各种成分分离于不同区带。常用载体有聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）、琼脂糖凝胶电泳等。免疫球蛋白（Ig）增殖可见单克隆和多克隆增殖带，后者是宽而浓的区带，扫描后峰形呈钝圆，高/宽<1.0，而M蛋白带（单克隆带）是窄而浓的区带，高而尖的峰形，高/宽>1.0。M蛋白带通常出现在γ区，也可出现在β区或β与γ区之间，少数患者也可在α_2区出现（μ链、α链、IgA半分子等）。

2. Ig定量 检测方法参见免疫球蛋白定量测定。一般M蛋白所属Ig含量均显著增高，其他类Ig降低或显著降低。

3. 免疫电泳 是一种用于诊断Ig异常的常规方法。原理是电泳时血清中各种蛋白质组分由于静电荷的不同，移动速度不同，被分离于不同的区带。停止电泳后，在电泳平行位置挖槽，加入抗血清扩散，抗原抗体反应后即可在相应位置上形成肉眼可见的沉淀弧。M蛋白的特点是与相应的抗重链血清、抗轻链血清形成迁移范围十分局限的浓密的沉淀弧。

4. 免疫固定电泳 待测血清或尿在载体上电泳后，使不同的蛋白质形成电泳位置不同的区带，将特异性抗重链或抗轻链血清加于载体上，抗血清即可与相应的蛋白区带结合（例如抗Kappa链抗血清与Kappa轻链区带结合），形成抗原抗体复合物，使抗原在电泳位置上被免疫固定，洗涤时不被洗脱，而无关蛋白区带则被洗脱。再用酶标记抗人Ig与之反应并随后浸入酶底物/色原溶液中时，被测蛋白区带可呈色。

此法的主要用途为：鉴定迁移率近似的蛋白质组分，如各种M蛋白；鉴定Ig的轻链；鉴定血液和体液中的微量蛋白。

5. 本周蛋白（Bence Jones protein，BJP）检测 本周蛋白是首次由Henry Bence Jones于1846年发现的一种异常尿蛋白，特点是在酸性条件下，将尿加热到60℃即见蛋白沉淀，在加热到100℃时沉淀溶解，尿又呈现透明。1962年Edelman证实其本质即Ig的轻链（主要以轻链的二聚体形式存在）。检测本周蛋白的定性方法有热沉淀反应法（Putnam实验）、对甲苯磺酸法（Cohen法）和免疫固定电泳。定量方法可用速率散射比浊法和ELISA法。

[临床意义]

1. 恶性M蛋白血症

(1) 多发性骨髓瘤（MM）：占M蛋白血症的35%～65%，其中IgG类占50%左右，IgA类占25%左右，轻链病占10%～20%，IgD类占0.7%～5.7%（平均为1.6%），IgE类罕见。

(2) Waldenstrom 巨球蛋白血症：占 M 蛋白血症的 9%～14%，以分泌 IgM 蛋白的淋巴样浆细胞恶性增生为特征。

(3) 重链病：是一类淋巴细胞和浆细胞的恶性肿瘤或为淋巴样浆细胞的恶性肿瘤，不同于多发性骨髓瘤，也有异于淋巴细胞瘤，而是一种原因不明、合成免疫球蛋白障碍或重链的部分缺失，也可能组装障碍，细胞内只合成不完整片段的一种特种类型。M 蛋白为免疫球蛋白的 Fc 段，已发现 α、γ、μ 和 δ 重链病。

(4) 轻链病：相对少见，与多数 M 蛋白血症发病年龄不同的是此病多见于青壮年。血中各免疫球蛋白含量均见减低或正常。血清和尿液均可在 β 区（多在 β_2 区）出现 M 成分。半数以上患者有严重蛋白尿，每天>2.0g，BJP 阳性，多数 0.2g/d，且属于 κ 或 λ 某一型。

(5) 半分子病：M 蛋白由 Ig 的一条重链和一条轻链构成。现已发现 IgA 类与 IgG 类半分子病。此病临床表现和多发性骨髓瘤相同，唯一不同的是尿中出现的 M 蛋白皆为小分子。

(6) 7sIgM 病（Solomen-Kunkel 病）：M 蛋白为 IgM 单体。

(7) 双 M 蛋白血症：约占 M 蛋白血症的 1%左右，其特征为电泳时，在 γ～α_2 范围内出现 2 条浓密区带，当用光密度计扫描时可呈现 2 个典型的基底窄、峰形尖锐的蛋白峰。以多发性骨髓瘤和巨球蛋白血症最为多见，也见于粒细胞性白血病、肝病和其他恶性肿瘤。

2. 良性 M 蛋白血症　是指有些病人或正常人，在血清中出现一个或几个高浓度的 M 蛋白，但无临床上的相应表现，长期随访也无多发性骨髓瘤或巨球蛋白血症的证据。发生率与年龄有明显关系，多见于老年人。有人指出，20 岁以上的健康供血员检出 M 蛋白者约占 0.1%～0.3%；70 岁以上健康人升至 3%；95 岁以上健康人则接近 20%。良性 M 蛋白血症与多发性骨髓瘤的早期很难区别，但骨 X 线检查一般无溶骨性改变；骨髓穿刺检查，浆细胞或淋巴样细胞一般<5%（多发性骨髓瘤常>20%）。良性 M 蛋白血症中一部分人在若干年后可表现出典型的恶性 M 蛋白血症的特征。因此，对于有良性 M 蛋白血症的人来说，最重要的是长期随访。

第五章　细胞免疫功能分析

细胞免疫功能的效应细胞是T淋巴细胞（T细胞）。T细胞是一群功能不同的异质性淋巴细胞，因在胸腺（thymus）内分化成熟故名。循环中功能不同的成熟T细胞均为小淋巴细胞，不能从形态上加以区分，但可依据表型（细胞表面分子标志）和功能的不同分成不同的亚群。最常用于亚群分析的表型是CD（cluster of differentiation）分子，即分化群分子，也称分化抗原。细胞（白细胞、血小板、内皮细胞等）表面的CD分子目前已约250种。它们广泛参与细胞的生长，成熟、分化、迁移、活化，参与免疫识别、免疫粘附与免疫调节。

外周血T细胞都是$CD3^+$细胞，根据CD4和CD8分子的有无，可分为$CD3^+CD4^+$和$CD3^+CD8^+$两个亚群。$CD4^+$T细胞在功能上主要是辅助T细胞（T helper cells，Th）；$CD8^+$T细胞在功能上主要是细胞毒性T细胞（cytotoxic T lymphocytes，CTL或T cytotoxic cells，Tc）。根据分泌细胞因子的不同，$CD4^+$T细胞又分为Th1和Th2两个亚群。Th1亚群主要产生IL-2、IL-12、TNF-γ、TNF-β等细胞因子，辅助$CD8^+$T细胞和吞噬细胞参与和促进细胞介导的免疫应答，而Th2亚群主要产生IL-4、IL-5、IL-6、IL-10等细胞因子，辅助和促进B淋巴细胞的增殖、分化和成熟，促进抗体生成，故可增强抗体介导的体液免疫应答。目前，常规的细胞免疫功能分析主要分体内实验和体外实验两类，前者是用特异抗原或有丝分裂原进行皮内实验；后者主要测试外周血中T淋巴细胞数量、增殖功能、亚群及产生细胞因子的能力。

第一节　皮内实验

［概述］

检测细胞免疫功能的皮内实验属于皮肤迟发型变态反应实验。原理是将特异性抗原或有丝分裂原注入患者皮内，使体内存在的致敏T淋巴细胞或未致敏的T淋巴细胞被激活，产生淋巴细胞因子，引起局部充血、水肿、细胞浸润。根据局部皮肤发红、硬结的有无以及直径的大小来判定反应的强度。常用的特异性抗原有结核菌素、链激酶、链道酶等。常用的有丝分裂原为PHA

（植物血凝素）。特异性抗原多为病原生物的代谢产物，受试者多因过去接触过该抗原而致敏，故不需经过人工致敏即可直接进行皮试，较为简单易行，但个体差异较大。PHA 引起的反应类似其他皮试抗原所致的反应，儿童和成人中92%～100%可出现阳性反应。

［临床意义］

皮试反应性降低的生理与病理情况为：

1. 生理情况　老年人，皮质类固醇或其他免疫抑制剂治疗，放疗，维生素缺乏，铁缺乏，蛋白性营养不良等。

2. 免疫缺陷　先天性免疫缺陷，如严重的联合免疫缺陷、DiGeorge 综合征、Nezelof 综合征等。

3. 严重感染　病毒性传染病（如艾滋病）、细菌性传染病（结核、麻风、革兰阴性杆菌感染等）、深部真菌性感染。

4. 肿瘤　霍奇金病、急性白血病等。

5. 其他　肝硬化、甲状腺功能低下等。

第二节　T 淋巴细胞花环实验

［概述］

T 淋巴细胞（T 细胞）表面有绵羊红细胞（SRBC）受体，可与 SRBC 结合形成花环。在 4℃反应 2 小时形成的花环，代表 T 细胞总数，称为 Et 花环。淋巴细胞与 SRBC 混合后，不经 4℃作用，立即反应生成的花环，代表 T 细胞的一个亚群，对 SRBC 的亲和性高，称为活性 E 花环（Ea）。淋巴细胞与 SRBC 在 37℃ 30 分钟形成的花环代表未成熟的 T 细胞，称为稳定性 E 花环（Es）。

［参考值］

Et：64%±6.7%，Ea：23.6%±3.5%，Es 3.3%±2.6%。

［临床意义］

1. 有助于细胞免疫缺损性疾病的诊断和疗效观察。原发性特异性细胞免疫缺损性疾病如 Digeorge 综合征（胸腺无能综合征）、Nezelof 综合征（胸腺发育不全症）以及原发性细胞和体液免疫同时缺损性疾病，E 花环值均可明显降低。用胸腺素等治疗有应答者，E 花环值可增高，特别是 Ea RFC 增高更明显。

2. 有助于监测恶性肿瘤疗效及预后。一些恶性肿瘤病人 E 花环值降低，且与病情和疗效有关。有人认为 Ea 较 Et 更能反映临床情况，Ea 值的降低可

早于病情恶化（转移或复发）的临床症状和其他检查的结果，而此时 Et RFC 仍属正常。

3. E 花环值降低的其他疾病

（1）某些病毒感染：麻疹、麻疹脑炎、腮腺炎、流感及带状疱疹等。

（2）自身免疫性疾病：系统性红斑狼疮、皮肌炎等。

（3）放射治疗及应用激素、免疫抑制剂时。

（4）瘤型麻风病。

4. E 花环值增高的疾病

（1）甲亢和甲状腺炎患者，病情缓解可恢复正常。

（2）重症肌无力及移植排斥时 Et RFC 增高。

5. Es 花环形成细胞增多，亦可见于慢性活动性或慢性迁延性肝炎、急性淋巴细胞性白血病、SLE 等。

第三节 淋巴母细胞转化实验和淋巴细胞增殖实验

一、淋巴母细胞转化实验

实验原理是 T 淋巴细胞在体外培养过程中受到有丝分裂原植物血凝素（PHA）刺激，可转化成体积较大的母细胞，胞浆变多而深染，核染色质疏松并出现核仁。被某种抗原致敏的 T 淋巴细胞，在体外再次遇到相应抗原时，转化为母细胞，称特异性转化。计数转化的细胞，可反映机体的细胞免疫功能。

［参考值］

60.1%±7.6%。

［临床意义］

是观测患者细胞免疫功能的一项指标，恶性肿瘤，霍奇金（Hodgkin）病、淋巴瘤、淋巴肉芽肿、Sjögren 综合征、重症真菌感染、重症结核、瘤型麻风等转化率可低于正常值。

二、MTT 比色法

实验原理是，四甲基偶氮唑盐［3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheny tetrazolium bromide，MTT］在活细胞线粒体的琥珀酸脱氢酶作用下，被还原成蓝黑色的 MTT-甲嚐，形成 MTT 甲嚐的量与细胞增殖程度呈正相关。通过测定细胞形成 MTT 甲嚐的量，可间接定量分析细胞的增殖情况。

第四节 T细胞亚群分析

分析T细胞亚群通常是利用抗分化抗原的单克隆抗体（McAb），如抗CD3、抗CD4、抗CD8单抗对外周血单个核细胞进行检测，依$CD3^+$、$CD4^+$和$CD8^+$细胞的阳性率，判定人全T细胞、T辅助/诱导细胞（Th/Ti）、T抑制/杀伤细胞（Ts/Tc）亚群的分布。常用方法为：免疫荧光法、免疫酶法、SPA花环法和流式细胞术。

除以上三种T细胞亚群之外，还有CD2（花环细胞）、CD16和CD56（NK细胞）、CD25（激活淋巴细胞）以及CD95（凋亡淋巴细胞）等亦可按本节常规方法检测。

一、免疫荧光法

此法原理与一般间接免疫荧光法相同。先用小鼠抗人分化抗原的McAb与外周血单个细胞反应，洗去未结合的McAb后，加入兔抗小鼠IgG荧光抗体，经反应并洗涤后，于荧光显微镜下观察荧光阳性细胞或用流式细胞仪（FCM）自动计数。

［参考值］

$CD3^+$细胞阳性率（69.1%±6.2%）；$CD4^+$细胞阳性率（45.7%±5.3%）；$CD8^+$细胞阳性率（27.9%±5.0%）；CD4/CD8比值为（1.2～1.8）。

二、AP-AAP桥联酶免疫检测法

实验原理是碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）和小鼠抗碱性磷酸酶抗体结合形成的可溶性复合物（AP-AAP），保留ALP活性和小鼠Ig的抗原性。当淋巴细胞上的CD抗原与加入的小鼠抗CDMcAb（第一抗体）反应后，再相继与桥联抗体兔抗小鼠IgG和AP-AAP复合物反应，在与底物作用后，含对应抗原的阳性细胞即可呈色。

［参考值］

同免疫荧光法。

三、SPA花环法

有三种方法：McAb-A-E法、直接SPA菌花环法、间接SPA菌花环法。McAb-A-E法的原理是用氯化铬处理醛化红细胞使与金黄色葡萄球菌A蛋白（SPA）结合，再利用SPA能与抗体Fc段结合的特性，分别制成经抗CD3、

抗 CD4、抗 CD8McAb 致敏的红细胞。在与淋巴细胞反应时，此致敏红细胞上的 McAb 即可与淋巴细胞上的 CD3、CD4 或 CD8 结合，在淋巴细胞周围形成红细胞花环。直接 SPA 菌花环的原理是将含有 SPA 的金葡菌用上述 McAb 分别致敏，制成抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8 致敏的 SPA 菌。在与淋巴细胞反应时 SPA 菌上的 McAb 可与细胞上的相应 CD 抗原结合，形成 SPA 菌花环。间接 SPA 菌花环的原理是先用 McAb 与淋巴细胞反应，再加兔抗小鼠 IgG 致敏的 SPA 菌，阳性反应时也形成 SPA 菌花环。

[参考值]

同免疫荧光法。

[临床意义]

1. T 淋巴细胞各亚群之间有互相制约和互相辅助作用，亦即 T 亚群之间有平衡作用，任何一方的增多或减少皆影响另一亚群，形成失调。因此，应用 CD4/CD8 比值更能反映免疫调节的变化。另外，近来研究还发现，T 辅助细胞中还分为诱导辅助细胞亚群（$CD4^+$、$CD29^+$）和诱导抑制细胞亚群（$CD4^+$、$CD45^+$）；T 抑制细胞又分细胞毒 T 细胞（$CD8^+$、$CD28^+$）和抑制细胞亚群（$CD8^+$、$CD28^-$）。因此，检查 T 细胞亚群可更深入地了解细胞免疫功能。

2. $CD4^+$ 细胞在恶性肿瘤、遗传性免疫缺陷、AIDS、应用免疫抑制剂（如环孢素 A）等患者中皆可降低。$CD8^+$ 细胞增高见于自身免疫病，如 SLE、慢性活动性肝炎等。

3. CD4/CD8 比值在 AIDS 时显著降低。此外，还可用来监测器官移植的排斥反应，若移植后 CD4/CD8 的比值较移植前明显增加，则预示可能发生排异反应。

第五节 细胞因子测定

一、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）

[概述]

肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）是一类单核细胞因子，包括 TNF-α 和 TNF-β（又称淋巴毒素，相对分子质量 25 000）两类。TNF-α 又称恶病质素，相对分子质量 17 000，常以二聚体形式存在。由单核-吞噬细胞、中性粒细胞、NK 细胞、活化的 T 淋巴细胞（$CD4^+$ T 细胞的 Th1 细胞亚群）、活化的血管内皮细胞以及其他细胞产生。编码基因分子结构及很多功能都与

TNF-β近似。具有广泛的生物学活性，是吞噬细胞被脂多糖（LPS）和其他细菌产物活化后分泌的一种重要的炎症细胞因子，也是一种致热原。能促进IL-1、IL-6、IL-8以及急性期反应物质（如淀粉样蛋白A）的产生，增强T细胞、B细胞对抗原刺激的增殖反应，增强细胞毒T细胞的作用，增强MHCⅠ类抗原的表达，引起白细胞增多和内皮细胞的粘附性增强，是中性粒细胞功能的启动因子。对多种肿瘤细胞和病毒感染细胞有抑制生长或细胞毒作用。

［免疫学检验］

测定TNF-α有双抗体夹心ELISA法和BioELISA法。后者在实验中引入生物素和链霉亲合素。

［参考值］

参考试剂盒提供的参考值。

［临床意义］

TNF-α的生物学活性非常复杂，涉及免疫调控，感染与炎症反应，肿瘤细胞生长的抑制，对造血、心、肝、肾、肌肉等系统功能的影响，以及器官移植的排斥反应等，与败血症、恶病质、心功能衰竭都有密切关系。由于缺乏疾病特异性，测定血清TNF-α水平不能用于疾病的诊断与鉴别，但可作为病情、治疗效果以及预后的评估指标。

二、干扰素（IFN）

［概述］

干扰素（interferon，IFN）是一组能诱导细胞抗病毒感染和其他多种生物活性的细胞因子。干扰素不直接杀伤病毒，而是诱导宿主细胞产生多种酶来干扰病毒复制的各个环节。根据与受体结合的特性，可将干扰素分为两型。Ⅰ型干扰素即IFN-α（相对分子质量18 000～20 000）和IFN-β（相对分子质量23 000），前者由单核-吞噬细胞分泌，后者主要由成纤维细胞分泌，二者的主要生物学活性是抗肿瘤（抑制细胞分裂）和抗病毒（抑制病毒复制）。Ⅱ型干扰素即γ-干扰素（IFN-γ），又称免疫干扰素，是由活化的T淋巴细胞（$CD4^+$的Th1亚群和$CD8^+$ T细胞）和NK细胞分泌的一种重要的吞噬细胞中性粒细胞活化因子，也是B细胞、NK细胞的分化因子。是由2个亚单位构成的相对分子质量21 000～24 000的二聚体糖蛋白。除抗病毒作用外，它更重要的是起免疫调节作用，能诱导MHCⅠ类和MHCⅡ类抗原在很多细胞（吞噬细胞、NK细胞、B细胞、内皮细胞、结缔组织细胞等）表达；增强吞噬细胞对细胞内病原体的杀伤作用。

[免疫学检验]

由于 IFN-γ 是 Th1 细胞亚群的最主要的效应因子，故临床最常检测的是 IFN-γ，常用检测方法为 ELISA 法。

[参考值]

参考试剂盒提供的参考值。

[临床意义]

IFN-γ 是一种重要的免疫调控分子，其血清水平的升高或降低主要反映机体细胞免疫功能的变化，并无疾病特异性，也不能用于疾病的诊断和鉴别。由于 IFN-γ 是 $CD4^+$ T 细胞中的 Th1 细胞亚群的主要效应因子，故目前临床检测血清 IFN-γ 水平主要用于 Th1/Th2 细胞失衡的研究。

三、白细胞介素-1（IL-1）

[概述]

IL-1 主要由活化的单核-吞噬细胞产生，亦可由其他多种细胞合成并分泌，如内皮细胞、上皮细胞、活化的 B 细胞、肾小球系膜细胞等。IL-1 包括 IL-1α 和 IL-1β，两种 IL-1 多肽分子的氨基酸序列同源性为 25%～30%，相对分子质量均约为 17 000，均能识别并结合相同的受体，且发挥相似的生物学功能。人体内 IL-1 活性主要由 IL-1β 介导。低浓度的 IL-1 在局部起免疫调节作用，如协同刺激 Th 细胞及 B 细胞增殖分化、增强 NK 细胞杀伤活性等。高浓度的 IL-1 在血循环中具有内分泌激素样作用，可诱导产生急性期蛋白，如 C-反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A（SAA）等；促进骨髓释放中性粒细胞，诱导单核细胞和多形核粒细胞趋化浸润到炎症局部，在局部释放溶酶体酶介导炎性反应及引起发热反应。

[免疫学检验]

测定血清 IL-1 含量可采用 ELISA 法或放射免疫法。

[临床意义]

血清 IL-1 水平在急性炎症（如革兰阴性菌毒血症、全身性炎症反应综合征）、同种异体移植物排斥反应时显著升高。此项检查目前主要用于疾病发病机制、病情监测和预后转归方面的研究。

四、白细胞介素-2（IL-2）

[概述]

IL-2 主要由 T 辅助性淋巴细胞合成和分泌。体外用丝裂原如植物血凝素（PHA）、刀豆蛋白 A 刺激 CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞，PBMC，扁桃体、脾脏淋巴细

胞也可产生。某些白血病细胞、淋巴瘤细胞和病毒转化的细胞经诱导剂刺激后可产生高水平的 IL-2。IL-2 是一种糖蛋白，相对分子质量 15 000，半衰期为 6.9 分钟，主要生物学活性为：刺激 T 淋巴细胞受体和 MHC-Ⅱ类抗原的表达，促进产生 IFN-γ、TNF-β、IL-4、IL-5、IL-6 及 CSF 等细胞因子；诱导 NK、CTL、LAK 等细胞的增殖、分化和效应表达，使之产生 IFN-γ、TNF-α 等淋巴因子，在体内形成 IL-2-IFN-NK 细胞正向免疫调节功能；促进 B 淋巴细胞的增殖、分化和抗体形成；活化吞噬细胞。

［免疫学检验］

血清或体液中 IL-2 的含量测定可采用 ELISA 法或放射免疫法。

［参考值］

参考试剂盒提供的参考值。

［临床意义］

血清 IL-2 水平升高与细胞增殖反应增强有关，在急性炎症初期（如革兰阴性菌毒血症、全身性炎症反应综合征）及同种异体移植物排斥反应等急性期反应时可显著升高。此项检查目前主要应用在疾病发病机制、病情监测和预后转归方面。

五、白细胞介素-2 受体（IL-2R）

［概述］

白介素 2 受体（interleukin 2 receptor，IL-2R）有 α、β 两条链，单链的 IL-2Rα 相对分子质量 55 000，为低亲和力受体，单链的 IL-2Rβ 相对分子质量 75 000，为中等亲和力受体。两条链结合为 IL-2Rα、β 时才具有高亲和力。通常静止的 T 细胞上具有中亲和性的 IL-2R，T 细胞活化时表达出高亲和性的 IL-2R。IL-2R 以细胞膜 IL-2R（mIL-2R）和可溶性 IL-2R（sIL-2R）两种形式存在，后者为活化淋巴细胞膜上脱落的 IL-2Rα 链成分。sIL-2R 可与 mIL-2R 竞争结合 IL-2，使 IL-2 廓清加速，进而下调 IL-2 依赖的 T 细胞增殖，减弱免疫应答反应，使 IL-2 的效应细胞如 NK、CTL 等细胞功能降低。

［免疫学检验］

血清或体液中 IL-2R 的含量测定可采用 ELISA 法或放射免疫法。

［参考值］

参考试剂盒提供的参考值。

［临床意义］

血清 sIL-2R 水平升高反映了 mIL-2R 从细胞膜上脱落，活化的淋巴细胞处于抑制状态，Th1/Th2 平衡失调。sIL-2R 水平升高常伴有 $CD4^+/CD8^+$ 比

值减低及 NK 细胞活性的降低，某些肿瘤、重型肺结核、烧伤、烫伤等患者血中 sIL-2R 水平可显著升高。此项检查主要应用在疾病发病机制、病情监测、药效观察和预后转归方面。

六、白细胞介素-6（IL-6）

［概述］

IL-6（interleukin-6）过去曾称为 IFN-β 2，是在炎症反应中具有重要作用的细胞因子，由单核-吞噬细胞、T 细胞（Th2）、B 细胞、血管内皮细胞以及免疫系统以外的很多其他细胞如基质细胞、成纤维细胞产生，相对分子质量 26 000。炎症信号如脂多糖、IL-1 和 TNF 可促进 IL-6 的产生。IL-6 的主要生物学活性为：促进 B 细胞分泌抗体（作用较 IL-4 迟）；促进胸腺细胞增殖、T 细胞的生长和 IL-2 的产生；促进骨髓干细胞的生长；刺激肝细胞产生 C 反应蛋白等急性期反应物质，并具有调节、促进或抑制肿瘤细胞生长的作用等。

［免疫学检验］

血清或体液中 IL-6 的含量测定可采用 ELISA 法或放射免疫法。

［参考值］

参考试剂盒提供的参考值。

［临床意义］

血清 IL-6 水平在急性炎症（例如全身性炎症反应综合征，SIRS）时升高，尿 IL-6 水平增高见于增殖性肾炎病人，IgA 肾炎和狼疮性肾炎疾病活动和进展时。IL-6 水平无疾病特异性，但可作为细胞因子级联反应激活的一个标志，反映机体炎症反应与疾病严重程度的关系。此项检查目前主要应用在疾病发病机制、病情监测和预后转归方面。

七、白细胞介素-8（IL-8）

［概述］

IL-8（interleukin-8）又称中性粒细胞活化蛋白-1（neutrophil activating protein-1，NAP-1）、α-趋化因子（α-chemokine），是趋化因子家族中第一个被报道的成员。正常情况下 IL-8 是相对分子质量 14 000 的同源二聚体，在炎症信号刺激下由单核-吞噬细胞、内皮细胞和其他细胞如 T 淋巴细胞、上皮细胞大量产生，是能够调节 T、B 淋巴细胞成熟分化的激素样分子。IL-8 对中性粒细胞、T 淋巴细胞、嗜碱性粒细胞具有趋化作用，可通过引起中性粒细胞胞浆内游离 Ca^{2+} 浓度的迅速增高，使细胞变形、脱颗粒、呼吸暴发和释放溶酶体酶使激活的中性粒细胞发挥黏附、释放杀菌物质，杀灭病原菌。因此，IL-8

在炎症反应和免疫调节过程中起重要作用。

[免疫学检验]

测定血清 IL-8 含量可采用 ELISA 法或放射免疫法。

[参考值]

参考试剂盒提供的参考值。

[临床意义]

血清 IL-8 水平在急性炎症（如全身性炎症反应综合征，SIRS）时显著升高，但无疾病特异性，不能用于疾病的诊断与鉴别。此项检查目前主要用于疾病发病机制（包括组织缺血再灌注损伤的发生机制）、病情监测和预后转归方面的研究。

八、抗炎症性细胞因子

（一）IL-10（interleukin-10）

[概述]

人白细胞介素-10（interleukin-10，IL-10）主要由 $CD4^+$ 的 Th2 细胞分泌，一些 Th1、Th0、活化单核-吞噬细胞以及 B 细胞等也产生 IL-10。IL-10 具有多项生物学活性，可作用于抗原递呈细胞（APC），降低其 MHC Ⅱ 类抗原的表达或诱导 APC 细胞生成产物，干扰细胞内的信号传递系统，选择性抑制 Th1 细胞产生 IL-1、TNF-α、IL-6、IL-8 以及 GM-CSF 等促炎性细胞因子，抑制 NK 细胞因子的产生；促进肥大细胞和胸腺细胞增殖；是有效的 B 细胞刺激因子，能协同 IL-4、IL-5 作用等。在免疫应答中主要发挥免疫抑制作用。

[免疫学检验]

血清中 IL-10 的含量测定可采用 ELISA 法或放射免疫法。

[参考值]

参考试剂盒提供的参考值。

[临床意义]

血清 IL-10 水平在炎症时升高，可作为细胞因子级联反应激活、反馈调节的一个标志，反映机体抗炎症反应与炎症转归的关系。此项检查目前主要应用在疾病发病机制、病情监测和预后转归方面。

（二）IL-4（interleukin-4）

[概述]

白细胞介素 4（interleukin-4，IL-4）主要由 $CD4^+$ 的 Th2 细胞经抗原或丝裂原刺激后分泌，分子量为 15 000，是 B 细胞的生长和分化因子，可促进 B 细胞 MHC Ⅱ 类抗原、IgE Fc 受体 Ⅱ（FcεR Ⅱ）/CD23 和 CD40 的表达，选择

性刺激定向产生 IgG1 和 IgE 的 B 细胞增殖和分化；可与 IL-3 协同刺激肥大细胞增殖，与 IL-2 协同刺激肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）的杀瘤活性，与 G-CSF 协同增强粒细胞集落形成，协同红细胞生成素（EPO）增强 BFU-E 的形成。在抑制炎症反应方面 IL-4 具有辅助 Th2 细胞，同时通过抑制内皮细胞及单核细胞合成分泌 IL-1、IL-6 和 TNF-α 等炎性因子减轻炎性介质对内皮细胞的损伤，降低组织因子表达过度引起凝血机制异常对微循环的影响等，通过对自身和相关抗炎性细胞因子合成的正反馈调节，发挥抑制炎性反应的作用。

［免疫学检验］

血清中 IL-4 的含量测定可采用 ELISA 法或放射免疫法。

［参考值］

参考试剂盒提供的参考值。

［临床意义］

血清 IL-4 含量测定缺乏疾病特异性，目前常用于研究 Th1/Th2 细胞失衡。

第六章　MHC-HLA 分析

在不同种属或同种不同系别的个体间进行正常组织或肿瘤移植会发生排斥反应，其本质上是一种免疫应答，它是由细胞表面的同种异型抗原诱导的，这种代表个体特异性的同种抗原称为移植抗原（transplantation antigen）或组织兼容性抗原（histocompatibility antigen）。机体参与排斥反应的抗原系统多达20个以上，其中能引起强而迅速排斥反应的抗原称为主要（major）组织兼容性抗原，引起较弱排斥反应的抗原称为次要（minor）组织兼容性抗原。主要组织兼容性抗原包括多个系列，组成复杂的抗原系统，编码这一系统的基因位于同一染色体片段上，是一组紧密连锁的基因群，称为主要组织兼容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）。MHC 具有重要的免疫生物学意义：一方面，MHC 分子直接参与抗原递呈细胞（antigen presenting cell，APC）对内源性和外源性抗原的加工和处理；另一方面，在 T 细胞受体（T cell receptor，TCR）特异性识别 APC 所递呈的抗原肽过程中，必须同时识别与抗原肽结合形成复合物的 MHC 分子，才能产生 T 细胞激活的信号。在不同种属的哺乳类动物中，MHC 编码的抗原系统有不同的命名，但它们的组成、结构、分布和功能相似。人类主要组织兼容性抗原由于广泛表达在白细胞表面，所以又称为人类白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）。

第一节　HLA 复合体

一、HLA 复合体分区

人类的 MHC，即编码 HLA 的基因群称为 HLA 复合体，位于第 6 号染色体短臂 6p21.31 的一个窄小区域内，DNA 片段长约 3.6 Mb，占人体整个基因组的 1/3 000。在这个区域内的基因座位（locus）极为密集连锁，具有高度的多态性。迄今，HLA 复合体内共鉴定出 224 个基因座位，其中有产物表达的功能性基因 128 个，另外 96 个为假基因。HLA 复合体分为三个区，每一区内的 HLA 基因分别被称为 HLA-Ⅰ、HLA-Ⅱ、HLA-Ⅲ类基因。

（一）HLA-Ⅰ类基因区

位于HLA复合体远离着丝点的一端，长度约2Mb。该区分布着数十个HLA-Ⅰ类分子的基因座位，编码HLA-Ⅰ类分子的重链，其中HLA-A、HLA-B和HLA-C为经典的HLA-Ⅰ类基因。

（二）HLA-Ⅱ类基因区

位于HLA复合物近着丝点的一端，长度约1Mb。经典的HLA-Ⅱ类基因一般指HLA-DR、DP和DQ，编码HLA-Ⅱ类分子的α链和β链。3个经典的HLA-Ⅱ类基因亚区中，HLA-DP含有两对基因，其中DPA1和DPB1为功能基因，而另一对即DPA2和DPB2为假基因；DQ亚区中DQA1和DQB1是功能基因，DQA2、DQB2和DQB3的基因产物未能检出；DR亚区包括1个DRA基因及9个DRB基因，其中DRB1、B3、B4、B5是功能基因，而DRB2和DRB6～9是假基因。

（三）HLA-Ⅲ类基因区

占据HLA-Ⅰ类基因区和HLA-Ⅱ类基因区之间的1Mb区域，含有大量基因座位。该区许多基因座位编码分子的功能尚不清楚，但可以肯定的是，该区部分基因产物与固有免疫（innate immunity）及炎症有关，如补体成分C2、C4、B因子和肿瘤坏死因子家族成员LT-α和LT-β基因。

二、HLA抗原的分布

HLA-Ⅰ类抗原广泛分布于体内各种有核细胞包括血小板和网织红细胞表面。不同组织细胞的表达程度不同，外周血白细胞和淋巴结、脾脏淋巴细胞所表达的Ⅰ类抗原量最多，其次为肝、肾、皮肤、主动脉和肌肉组织，神经细胞和成熟的滋养层细胞不表达Ⅰ类抗原。成熟红细胞一般不表达Ⅰ类抗原，但幼稚红细胞却有表达，年轻红细胞上有少量表达。血小板除自身带有HLA-Ⅰ类抗原外，还可以从血浆吸附sHLA。HLA-Ⅱ类抗原的分布不如Ⅰ类抗原广泛，主要表达在某些免疫细胞表面，如树突状细胞、单核-吞噬细胞和B细胞。T细胞不表达Ⅱ类抗原，但其被特异性抗原等激活后，也产生一定数量的Ⅱ类抗原。

三、HLA复合体的遗传方式

（一）单元型（单倍体型）遗传方式

HLA复合体是一组紧密连锁的基因群，这些连锁在一条染色体上的等位基因很少发生同源染色体间的交换，这种HLA等位基因在同一条染色体上的组合称为单元型（haplotype）。在遗传过程中，单元型作为一个完整的遗传单

位由亲代传给子代。人是二倍体动物，每一细胞均有两个同源染色体组，分别来自父母双方，因此子女的 HLA 单元型一个来自父亲，一个来自母亲。在同胞之间比较 HLA 单元型型别只会出现下列三种可能性：

1. 两个单元型完全相同的几率为 25%。

2. 两个单元型完全不同的几率为 25%。

3. 有一个单元型完全相同的几率为 50%。亲代和子代之间必然有一个单元型相同，也只能有一个单元型相同。

（二）多态性现象

HLA 复合体是迄今已知人体最复杂的基因复合体，有高度的多态性，给器官移植过程中选择组织型别合适的供者带来很大的困难。

（三）连锁不平衡

HLA 复合体的各基因座位紧密连锁，某些基因比其他基因能更多或更少地连锁在一起，从而出现了连锁不平衡。

四、HLA 等位基因的命名原则

HLA 的广泛多态性最初表现为采用同种抗体可检出大量的血清学特异性（serologic specific），随着分子生物学的发展，自 20 世纪 90 年代开始，HLA 分型从传统的鉴定 HLA 抗原特异性发展到直接检测单个等位基因的 DNA 序列，从而揭示了 HLA 具有众多血清学特异性的分子基础。HLA 复合体是目前已知的最复杂的人类基因复合体，该复合体不仅具有多个基因座位，而且各基因座位均有众多的等位基因，每种等位基因编码相应型别的 HLA 抗原。目前，HLA 分型方法可采用血清学方法完成，或者采用分子分型方法（基因分型），其分子型别（molecular type）来自等位基因名称。血清学特异性和分子型别之间并非是简单的一对一关系，至 1991 年采用血清学方法鉴定到的 HLA 抗原特异性共 161 种，其后未再进行 HLA 等位基因编码产物特异性的鉴定，许多最新发现的等位基因还没有用血清学方法分型，因此也就没有明确的血清学特异性。

为了准确地描述 HLA 系统不同基因座位和同一基因座位不同等位基因的复杂情况，HLA 等位基因由世界卫生组织 HLA 系统因子命名委员会（WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system）统一命名，采用数字命名方法，并定期在《Tissue Antigens》杂志上发表有关新鉴定的 HLA 等位基因的详细资料，HLA 序列的官方数据库为 IMGT/HLA 序列数据库，其网址为 www. ebi. ac. uk/imgt/hla，该数据库每隔 3 个月更新一次。截至 2006 年 8 月，该数据库已经包括 1 603 个Ⅰ类等位基因和 832 个Ⅱ类等位基因，其他

等位基因 97 个。

根据 2002、2004 年版本的《HLA 系统命名规则》，每个 HLA 等位基因采用唯一的 4 位、6 位或 8 位数字表示。等位基因命名的数字长度根据其序列及其最接近的基因决定，至少采用 4 位数字命名，必要时采用 6 位和 8 位数字。HLA 基因座位采用大写字母右上角加星号（*）表示，星号前为基因座位，星号后为等位基因。前两位数字表示型别（type），通常与同种抗体确定的血清学特异性（抗原）相对应。第 3、4 位数字用于表示亚型（subtype），这两位数字按照 DNA 序列被确定的先后顺序排列。前 4 位数字不同的等位基因之间肯定有一个或一个以上的核苷酸不同，其编码蛋白的氨基酸序列也有所改变。如果等位基因仅仅由于编码序列中的核苷酸同义置换（又称为沉默或非编码置换）而不同，可采用第 5、6 位数字表示，这种核苷酸碱基的置换不改变所编码的氨基酸序列，因此对应的 HLA 抗原的分子结构没有改变。第 7、8 位数字表示等位基因在内含子区域或外显子、内含子侧面的 5′、3′端非翻译区序列不同。有时需在上述等位基因数字后添加字母后缀，以表示其编码产物的表达状态，后缀“N”表示不能表达的无效等位基因，可选择性表达的等位基因则采用后缀“S”、“C”、“A”或“Q”表示。其中“L”表示在细胞表面呈低水平表达；“S”表示表达分泌型的可溶性分子，不存在于细胞表面；“C”表示等位基因产物仅存在于细胞质内而不在细胞表面；“A”表示异常表达；“Q”表示等位基因的表达有疑问。截至 2006 年 6 月，还没有等位基因采用“C”或“A”后缀命名。见表 6-1。

表 6-1 HLA 等位基因命名示例

命 名	含 义
HLA-DRB1	表示一个具体的 HLA 基因座位，即 DRB1
HLA-DRB1* 13	表示一组编码 DR13 抗原的等位基因，通常称为“低分辨”
HLA-DRB1* 1301	表示一个特异性的 HLA 等位基因，等位基因之间的序列改变可导致氨基酸置换
HLA-DRB1* 1301N	表示一个无效等位基因
HLA-DRB1* 130102	表示一个等位基因的同义突变，序列改变不会导致氨基酸置换
HLA-DRB1* 13010102	表示一个等位基因在编码区之外存在突变
HLA-A* 2409N	表示一个无效等位基因
HLA-A* 3014L	表示一个等位基因编码的蛋白水平明显下降
HLA-A* 24020102L	表示一个等位基因编码的蛋白水平明显下降，但突变在编码区之外

第二节 血清学分析

［概述］

最早用于检查 HLA 多态性的方法完全基于血清学技术，1962 年，Shulman 等人根据经典的补体结合原理，提出了微量补体结合方法，并一度作为检查白细胞抗原的流行方法。但这个方法还不够敏感，只能检出有限数量的白细胞抗原。1964 年，Tesarik 和 McClelland 发明了微量淋巴细胞毒实验，并创造了一套相应的器材。该方法不仅敏感性稳定，而且达到了微量化，使 1ml 分型血清可以检查 1 000 个人的细胞样本，使得大规模分析 HLA 成为现实。

血清学方法所使用的血清含有抗 HLA 抗原的抗体，这些抗体特异性地针对决定了不同 HLA 抗原的抗原决定簇。因此，将含有 HLA 抗体的血清与淋巴细胞混合时，抗体仅结合其特异性的靶细胞。一旦细胞表面形成抗原抗体复合物，在补体存在的情况下，补体激活而导致细胞裂解。血清学技术在研究 HLA 的多态性及其功能意义，器官移植组织配型，尤其是筛选异基因骨髓移植无关供体，建立“骨髓库”等方面发挥了重要作用。

［实验方法］

1. 补体依赖的淋巴细胞毒实验（complement-dependent lymphocytotoxicity test，CDC） 美国国立卫生研究院（NIH）的标准 CDC 方法为：从外周血中分离淋巴细胞，细胞浓度调整为 2×10^6/ml；将 1μl 分型血清和 1μl 细胞悬液加入 HLA 分型板的微孔中，混合后温育 30 分钟；然后加入 5μl 补体（通常为兔血清），温育 60 分钟。如果血清中的抗-HLA 抗体与淋巴细胞表面的相应 HLA 抗原结合，在补体存在的情况下，引起细胞溶解和细胞膜损害，细胞膜通透性增加；活体染料（如伊红 Y）渗入细胞，使细胞着色，而无该 HLA 抗原的细胞则不着色。

所用的靶细胞通常为外周血淋巴细胞（PBL），可通过密度梯度离心法从抗凝全血中分离，尸体供者的淋巴细胞则从脾脏或淋巴结分离。HLA-Ⅱ类抗原 HLA-DR、-DQ 的分型采用富含 B 细胞的淋巴细胞悬液，须采用特殊的分离方法（如尼龙棉吸附法），因为正常外周血淋巴细胞中约 80%为 T 细胞，其表面缺少 HLA-Ⅱ类抗原。目前，采用抗体包被的磁珠分离 T、B 细胞较为常用，可获得足量且纯度相对较高的细胞，抗 CD2 或抗 CD8 磁珠用于分离 T 细胞，抗 CD19 磁珠用于分离 B 细胞。

对曾经暴露于外来 HLA 抗原的个体进行筛查，可得到 HLA 分型试剂（HLA 标准抗血清），最容易产生高效价 HLA 分型试剂的来源是有过多次妊

娠史的妇女。在妊娠期间，胎儿的少量白细胞会通过胎盘进入母体血循环，胎儿的一半白细胞抗原来自父亲，产妇暴露于这种非自身抗原后可产生抗 HLA 特异性抗体。将这些妇女的血清采用一组已知 HLA 表型的细胞进行筛选，根据阳性反应的格局来分析所测抗体的特异性，这些已知特异性的血清即可作为分型试剂。目前，绝大多数 HLA 分型实验室已经采用商品化的单克隆抗体分型板。

2. 抗体筛查实验（antibody screening）

（1）CDC 法抗体筛查实验：采用一组含人群中最常见 HLA 抗原型别的细胞，组成各种 HLA-A 和 HLA-B 抗原的组合（或者针对Ⅱ类抗体的 DR 和 DQ 抗原），测定患者血清中是否存在抗 HLA 抗体，并鉴定抗体的特异性。这是传统的抗体筛查方法，筛查的形式可设计为针对一群患者的一批实验或者针对单个患者的一次实验。阳性细胞数与总细胞数的比值乘以 100 即为群体反应性抗体（panel reactive antibody，PRA）的百分比。

（2）酶联免疫吸附实验（ELISA）抗体筛查实验：将纯化的 HLA 抗原固定在塑料板上，用于捕获患者血清中的抗 HLA 抗体。亲和纯化的 HLA 抗原来自血小板或淋巴母细胞样细胞株，从血小板分离的抗原只有Ⅰ类抗原，而从细胞株分离的抗原可为Ⅰ类、Ⅱ类抗原，或者两者皆有。患者血清加入测试孔中温育，如果存在抗 HLA 抗体即可结合包被的抗原；洗涤除去未结合的抗体后，加入酶标记的抗人 IgG 抗体，再次温育洗涤后加入酶底物/色原溶液，即可显色产生阳性结果。采用 IgM 特异性二抗，可检测 IgM 类 HLA 抗体。

（3）流式细胞术（flow cytometry）抗体筛查实验：采用纯化的 HLA 抗原包被微珠（microbeads），根据包被的抗原不同，微珠可为纯化的 HLA-Ⅰ类、Ⅱ类抗原，或者两种抗原皆有。将此微珠与患者血清温育，如果患者血清中存在抗 HLA 抗体，则可形成微珠-抗原-抗体复合物；然后采用荧光素标记的抗人 IgG 抗体染色，利用敏感的流式细胞术测定患者的 PRA 值。通过不同荧光可将Ⅰ类抗原和Ⅱ类抗原的颗粒区分，因此运行一次流式细胞术分析可检测两种抗体。如果想要检测 IgM 类抗体，须使用荧光素标记的特异性抗人 IgM 抗体。

3. 交叉配合实验（crossmatching） 是指受者、供者间的血清与淋巴细胞的相互交叉配合，检测受者血清中是否存在抗供者 HLA 抗原的抗体。

（1）PBL 淋巴细胞毒交叉配合实验（PBL lymphocytotoxicity crossmatching）：是最简单的交叉配合实验。采用标准的 CDC 方法进行，其中供者 PBL 作为靶细胞。

（2）T 细胞淋巴细胞毒交叉配合实验（T-cell lymphocytotoxicity crossmatch-

ing)：采用标准的 CDC 方法，其中供者 T 细胞作为靶细胞。为了增加实验的敏感性，可延长细胞、血清和补体的温育时间，并在细胞和血清温育后、加入补体前洗涤一次，以除去血清中的抗补体因子。甚至可加入第二种抗体来增加敏感性，如兔抗人 IgG 试剂。

（3）B 细胞淋巴细胞毒交叉配合实验（B-cell lymphocytotoxicity crossmatching)：针对 HLA-Ⅱ类抗体的交叉配合实验需要使用 B 淋巴细胞作为靶细胞，采用标准的 CDC 方法。如果采用尼龙棉分离的 B 细胞，需要延长温育时间。

（4）流式细胞术交叉配合实验（flow cytometry crossmatching)：通过采用针对 T 细胞表面抗原的荧光抗体（如抗 CD3)，选择只有荧光标记的 T 细胞，将其与 B 细胞分离。将供者淋巴细胞与患者血清一起温育，然后加入一种抗人 IgG 抗体，该抗体采用不同颜色的荧光素标记（如抗 CD3 为红色，则采用发绿色荧光的荧光素标记)。经过流式细胞术分析，可显示出与抗体结合的细胞数量及荧光强度。也可设门选择被特异性荧光抗体标记的 B 细胞，然后进行交叉配合实验。

（5）自身抗体的交叉配合（crossmatching for autoantibodies)：采用患者自身血清和细胞作标准的 CDC 实验，用于检测自身抗体。

［参考值］

1. CDC 实验　根据每个孔中着色的死细胞数进行评分，有一半以上细胞死亡则判断为阳性。如表 6-2。

表 6-2　微量淋巴细胞毒实验的评分标准

每孔死亡细胞百分比（%）	评分	结　果
0～10	1	阴性
11～20	2	可疑阳性
21～50	4	弱阳性
51～80	6	阳性
81～100	8	强阳性

2. 抗体筛查实验　健康人各种抗体筛查实验应为阴性，有过妊娠史、输血史或器官移植史者可为阳性。

［结果分析］

1. CDC 实验　CDC 技术成熟，操作简捷、快速，对 HLA-Ⅰ类 A、B 抗原分型结果基本可靠，仍然是 HLA-Ⅰ类抗原分型的主要方法之一，而 HLA-Ⅱ类抗原的分型误差率高于 HLA-Ⅰ类抗原。存在的问题：

（1）每年都有许多新的 HLA 等位基因被发现，已经无法获得能够分辨出所有抗原特异性的标准抗血清。

（2）需要活的淋巴细胞，但一些特定条件下的尸体供者，样本的来源受到限制。

（3）由于 HLA 系统复杂的多态性，以及没有统一标准的分型试剂和补体来源，使得血清学结果可能出现变异。随着 HLA 分子分型的使用增加，目前绝大多数组织兼容性实验室已经采用分子方法进行 HLA-DR 和-DQ 分型，而使用分子方法进行Ⅰ类抗原分型每年也都在增加。

2. 抗体筛查实验　用于检测移植的候选患者是否存在 HLA 抗体，PRA 值表示患者对 HLA 的致敏程度。CDC 法抗体筛查实验检出 PRA 值高的血清，必须对血清进行稀释或处理后，才能确定抗体的特异性。

目前许多实验室开始使用 ELISA 和流式细胞术筛查 HLA 抗体，两者比 CDC 法更为敏感，特异性较高，可检测非补体结合的 HLA 抗体，且不再需要存活的淋巴细胞和补体。ELISA 抗体筛查实验可通过自动化读板仪快速、成批处理样本，但一般不能计算 PRA 值，也不能测定抗体的特异性。目前已经有厂家可提供不同 HLA 抗原组合的微珠产品，因此利用流式细胞术可鉴定所检测到的抗体特异性。

3. 交叉配合实验

（1）外周血淋巴细胞（PBL）淋巴细胞毒交叉配合实验：在给肾移植受体的候选存活亲属供者进行初次评估时，通常包括 PBL 交叉配合。正常 PBL 中约 80%为 T 细胞，仅携带 HLA-Ⅰ类抗原，20%为 B 细胞和单核细胞，携带 HLA-Ⅰ和Ⅱ类抗原。细胞毒交叉反应为强阳性（每孔 50%以上细胞死亡）就能清楚地表明存在抗 HLA-Ⅰ类抗原的抗体，但是如果仅 10%～20%的细胞被杀死，可能是由于抗 HLA-Ⅱ类抗原的特异性抗体所致，也可能是由于较弱的抗 HLA-Ⅰ类抗体所致。

（2）T 细胞淋巴细胞毒交叉配合实验：T 细胞交叉配合实验阳性为移植的禁忌证，不管其反应水平多弱。也就是说，评分 4 分的反应（每孔 21%～50%细胞死亡）和 6 分或 8 分（51%以上细胞死亡）的阳性结果是一样的。有些实验室甚至将 2 分（每孔 11%～20%细胞死亡）的反应作为交叉配合结果阳性。

（3）B 细胞淋巴细胞毒交叉配合实验：B 细胞交叉配合实验阳性提示抗体为抗 HLA-Ⅰ类或Ⅱ类抗原的抗体，或者两者皆有。另外，B 细胞对于较弱的抗 HLA-Ⅰ类抗体更为敏感，因为其携带的Ⅰ类抗原分子密度超过 T 细胞。

（4）流式细胞术交叉配合实验：流式细胞术交叉配合实验检测淋巴细胞上

的 IgG 类抗 HLA 抗体，其敏感性比肉眼观察结果的血清学方法敏感 30～250 倍。

(5) 自身抗体的交叉配合实验：在对患者血清做供者兼容性交叉配合实验时，自身抗体与特异性抗体的鉴别非常重要，因为自身抗体可导致供者交叉配合实验产生假阳性结果。所有活体供者每次血清交叉配合实验均要同时做自身交叉配合实验。

第三节 细胞学分型

[概述]

有些临床相关的可促发免疫应答的 HLA 分子，采用前述的血清学方法并不容易检出，而淋巴细胞可作为鉴别反应物（discriminatory reagents）用于检测供者和受者之间的兼容性。

[实验方法]

1. 纯合细胞分型（homozygous cell typing，HCT） 当供者和受者淋巴细胞在体外混合培养时，如果彼此的 HLA-D 位点有一个或两个等位基因不同，可相互刺激而转化为母细胞。将已知 HLA-D 抗原的淋巴细胞用丝裂霉素 C 或 X 线照射处理，成为只有抗原激发能力而无增殖反应能力的“刺激细胞”。将刺激细胞与待测淋巴细胞进行混合培养，根据待测细胞出现母细胞反应的程度，可判断待测淋巴细胞上是否具有与“刺激细胞”上相同的 HLA-D 抗原。刺激细胞最好用纯合子分型细胞（homozygote typing cell，HTC），因为纯合子的两个单元型完全相同而只有一种 D 抗原。

2. 预处理淋巴细胞分型实验（primed lymphocyte test，PLT） 首先取有一个单元型相同的两个个体的淋巴细胞进行混合培养，这在双亲与子女间很容易找到，如亲代 a/b，子代 a/c。先将 a/c 经 X 线照射作为刺激细胞，则反应细胞 a/b 只对 c 单元型抗原起反应。经 9～14 天混合培养，反应细胞分裂增殖逐渐停止，最后培养中留下已致敏的记忆细胞，称为 PLT 分型细胞。当待测淋巴细胞含 c 单元型抗原，则 PLT 细胞表现一种迅速的回忆反应，在 24～30 小时内迅速发生增殖。

[结果分析]

两种方法均以混合淋巴细胞培养（mixed lymphocyte culture，MLC）为技术基础，通过测定淋巴细胞在识别非己 HLA 抗原后发生的增殖反应来分析型别。HCT 用于测定 HLA-D 抗原，而 PLT 实验测定 HLA-DP 抗原。许多年以来，MLC 被认为是一种用于检测血清学分型方法无法解决的组织兼容性的

体外模型。由于分型细胞来源困难以及操作手续繁琐，细胞学分型技术正被逐渐淘汰，绝大多数专业实验室已经采用高分辨的分子 HLA 分型方法代替 MLC 实验。也有一些中心仍然采用 MLC 来监测造血干细胞和实体器官移植后的耐受性诱导（induction of tolerance）。

第四节 基 因 分 型

［概述］

随着分子生物学技术的发展，尤其是 PCR 技术问世之后，以 DNA 为基础的 HLA 分型技术已经成熟。1991 年第 11 届国际 HLA 专题讨论会上提出了 HLA 的基因分型方法，在 1996 年第 12 届国际 HLA 专题讨论会后，在整个 HLA 领域，基因分型取代血清学分型已成定局。以 DNA 序列差异为基础的 HLA 多态性分析与血清学和细胞学分型方法相比具有明显优势：

1. 基因分型方法可以使用多种不同类型的标本，只需要极少量标本，如头发、口腔拭子、干燥血点，甚至单个细胞等即可顺利进行，而不必像血清学方法一样依赖于细胞活性或细胞表面 HLA 相关抗原的表达。

2. 血清学分型方法所使用的试剂难以标准化，而基因分型技术所使用的引物、探针及 DNA 聚合酶等均可直接购买标准化的试剂。

3. 基因分型的准确性和精确性远胜于血清学或细胞学方法，WHO 命名报告显示相当一部分 HLA 等位基因亚型用血清学及细胞学方法难以检出。

4. PCR 扩增技术使 HLA 分析方法能根据扩增位点的碱基序列数据确定等位基因差异所在的位置，说明存在的是何种差异，并能分析特异性多态性氨基酸残基在抗原结合与递呈、疾病关联性以及临床移植预后中所起的作用。

一般将 HLA 基因分型的分辨率水平分为低、中、高三个水平。低分辨率只要求鉴定到“*”后 2 位数，即鉴定出对应的血清学宽特异性或窄特异性。中分辨率分型要求鉴定到“*”后 4 位数，由于分型试剂的限制，在这个水平上的基因分型往往得到一系列可能的结果，即一定的范围，而非特定的基因。在高分辨分型中，应该得到一个独一无二的等位基因，故又称为高等位基因分型。

目前所用的 HLA 基因分型技术主要采用基于核酸序列识别的方法，这些方法各有优点，也都存在无法克服的缺陷，如能配合使用，则能大大提高分型能力。

［实验方法］

1. PCR-RFLP（restriction fragment length polymorphism，限制性片段长

度多态性）技术　应用特异性引物，借助 PCR 技术扩增一个 HLA 基因座位或亚区，然后采用多种核酸酶对扩增产物进行限制性酶切，可得到长度不一的片段。由于不同 HLA 等位基因的限制性酶切位点分布不同，故电泳（首选聚丙烯酰胺凝胶电泳）后得到不同的电泳图谱。因为已知各等位基因的核酸序列和限制性酶切位点，通过仔细选择合适的特异性限制性酶，可有效地鉴定 HLA 等位基因。限制性酶的消化是关键，过度消化将导致特异性以外位点的切断，而不完全消化则产生假阴性结果。

2. PCR-SSP（sequence specific primer，序列特异性引物）技术　根据编码各种 HLA 抗原的等位基因序列，设计一整套等位基因序列特异性引物（sequence-specific primers，SSP）。提取待测标本基因组 DNA 后，用 SSP 进行 PCR 扩增相应的等位基因，而不扩增其他无关基因。电泳后，根据特异性 PCR 扩增产物的有无，分析相应 HLA 等位基因的型别。

3. PCR-SSOP（sequence specific oligonucleotide probe，序列特异性寡核苷酸探针）技术　借助 PCR 技术，应用等位基因或等位基因组特异性引物对目的基因进行扩增；将扩增产物转移至固相支持物（如尼龙膜）上，与放射性核（^{32}P）或非放射性（生物素、地高辛）标记的 SSOP 进行杂交，可以分辨出几乎所有等位基因的特异性亚型间的差异。常用的杂交方法有两种：传统的 PCR-SSOP 法是将 PCR 扩增的待测标本 DNA 固定在固相支持物上（如杂交膜），然后用标记的各种 SSOP 与之杂交；另一种为反向杂交法，即将探针固定在固相支持物上，然后与 PCR 扩增的待测标本 DNA 杂交。

4. PCR 指纹图谱（fingerprinting）技术　在 PCR 反应过程中，在特异性扩增 DNA 最后一个循环的退火期，单链 DNA 互相结合形成同一个体完全互补的同质双链，但某些单链 DNA 还可能与不同个体的单链 DNA 形成不完全互补的异质双链（heteroduplex）；由于不同个体的 DNA 具有不相同的分子构象，在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现特异的区带图谱，称为 PCR 指纹图谱。在进行 HLA 基因分型时，将供-受者的 DNA 扩增产物混合，电泳后得出一指纹图，再与两者各自得到的 PCR 指纹图谱进行比较，根据指纹图的一致性，作为选择供者的依据。

5. 直接测序法（sequencing-based typing，SBT）　SBT 首先用两侧引物对 HLA 基因多态性的区域进行 PCR 扩增，除去多余的碱基和引物后，对扩增获得的 DNA 进行序列分析，在计算机辅助下确定 HLA 等位基因的型别。

［结果分析］

1. PCR-RFLP　最常用于 HLA-Ⅱ类基因的分型，对 DRB1、DQA1、DQB1 和 DPB1 的分型准确而可靠，也有报道用于 HLA-A、C 等Ⅰ类基因的

分型。PCR-RFLP 的优点是明显提高了目的 DNA 的特异性，操作方法简便，所需设备较为简单，适合于个别标本和小样本的检测。缺点是：其检测的多态性位点必须正好处于酶切位点上才可分辨，否则无法检出。对高度多态性的 HLA-Ⅱ类基因分型时，酶切图谱复杂，需要多种酶才能分辨，且不能提供高分辨的结果，对某些杂合子结果的判断比较困难。

2. PCR-SSP 技术　每次反应必须设立内对照。当相应 SSP 扩增产物出现，表示基因组中存在与特异性引物（即 SSP）互补结合的 DNA 序列，即样本的该 HLA 基因阳性；如果内对照呈阳性，而 SSP 扩增产物没有出现，则可推断该 HLA 基因为阴性；如果 HLA 特异性产物和内对照产物均未出现，则扩增失败，需重新检测。根据基因座位和分辨率水平的不同，实验所需的引物数量不同。如在低分辨水平对 HLA-DRB 分型，需要 20～30 次反应，而 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 分型需要 100～200 次反应。随着 HLA 等位基因数量的增加，SSP 所需最少的反应数也相应增加。

本法的最大优势是所需设备较少，实验所需时间较短，结果易判读，从接受样本到完成 HLA 分型实验约需 3.5 小时，已广泛应用于 HLA-Ⅰ、Ⅱ类基因的检测。其主要缺点是需要大量扩增反应，使得批量处理样本的能力受到资源的限制，如同时可使用的热循环仪数量等。需要消耗相对多的引物和 DNA 聚合酶，使用相当多的 DNA 模板量。需要提取高纯度的 DNA 才能保证实验的特异性，不能检测新的等位基因，试剂盒需不断升级。

3. PCR-SSOP　灵敏度高，特异性强，可检出不同型别间 1～2 个碱基对的差异，是目前广泛应用的一种简单、快速而又精确的 HLA-Ⅱ类抗原分型方法，可鉴定所有已知序列的 HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP 等位基因。所需样本量少，每份样本只需要一次 PCR 扩增。可以同时对大量样本进行批量分型，与 PCR-SSP 分型相比，处理 96 份样本与处理 1 份样本在热循环仪、技术人员的时间和试剂等方面很少需要额外的支出。传统的 PCR-SSOP 法适合大量标本的检测，而反向杂交法适合少量标本的检测，通常探针的数量超过标本数时，反向杂交更为有效。缺点是：需要大量探针，且实验条件要求较高，不同探针的杂交条件须严格统一，易出现误差；不能检测新等位基因，试剂盒需不断升级；分辨率不及 PCR-SSP 和 SBT。

过去几年中，PCR-SSOP 系统在技术上进行了多种修改，以增加该方法在常规应用中的效率和可靠性。例如，寡核苷酸探针标记一开始采用放射性标记物（^{32}P），后来被生物素标记的探针替代，随后是增强的化学发光检测系统。机器人工作站和自动化（实时）开发系统已经代替了实验室的手工加样和结果的解读，从而减少了可能的人为错误。已经报道将探针结合于 96 孔板的微孔

底部，采用 ELISA 方法检测扩增的 DNA 与探针的杂交结果。

4. PCR 指纹图技术　用于选择非亲缘关系的骨髓和器官移植供者时，可节省大量时间，缺点是精确度较差。

5. SBT　SBT 是一种高分辨率的分型方法，能精确地检测出 HLA 基因位点上两个等位基因编码区的碱基序列，可大规模进行，并能直接发现新的等位基因。但不同等位基因之间可能存在单个碱基的差异，所以 SBT 对 HLA 基因型的精确判断取决于能否正确识别样本的每个碱基。然而，自动化序列分析的样本如果为杂合子，则可能产生不确定的结果。此外，当两个不同的样本表达不同的 HLA 等位基因，但其序列极为相似时，序列分析也可产生含糊的结果。

第五节　HLA 分型的临床意义

一、HLA 与疾病的相关性

HLA 是第一个被发现与疾病有明确联系的遗传系统，评估特定疾病与某种 HLA 抗原型别的相关性是通过相对危险性（relative risk，RR）的比较和计算来实现，其公式为：$RR=(P^{+}\times C^{-})/(P^{-}\times C^{+})$。式中 P^{+} 代表携带某种 HLA 抗原的患者数，C^{-} 代表不带此抗原的对照组人数，P^{-} 代表不带此抗原的患者数，C^{+} 代表具有此抗原的对照组人数。RR 表示携带某种型别 HLA 抗原的个体与无此种抗原的个体在患某种疾病的危险性上的比值：当 $RR=1$ 时，表示某种抗原在患者和正常对照中的分布无差异，即某种抗原与此病无关联；当 $RR<1$ 时，表示带某种抗原对此病有抵抗性或保护作用；当 $RR>1$ 时，则认为此病与某种 HLA 抗原有关；若 $RR>4$，则认为此病与某种 HLA 抗原肯定有关联，RR 值越大，表示携带此抗原的人患某病的危险性越大。

目前已经肯定有 50 多种疾病与 HLA 密切相关，其中强直性脊椎炎（ankylosing spondylitis，AS）是与 HLA 关联最强的疾病，在不同人种和地区中均已发现，HLA-B27 与 AS 关联的 RR 值很高。另外，90%的类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）患者表达 DR4/DR1 抗原，白种人中与 RA 关联的是编码 DR1 抗原的 DRB1* 0101，以及编码 DR4 抗原的 DRB1* 0401、DRB1* 0404、DRB1* 0408；中国和日本人中 RA 主要和编码 DR4 抗原的 DRB1* 0405 关联。

二、HLA与移植免疫

HLA兼容性在多个途径影响移植免疫：①针对HLA抗原的体液免疫机制：供体HLA抗原刺激受体B细胞产生同种抗体，该抗体是慢性排斥和移植失败的主要危险因素。Ⅰ类抗原HLA-A、B和C是同种抗体的主要靶抗原，Ⅱ类抗原HLA-DR、DQ的同种抗体反应性也可导致移植物丢失；②针对HLA抗原的细胞免疫机制：受体T细胞直接识别供体树突状细胞等抗原递呈细胞（APC）表面的HLA抗原，产生特异性针对供体HLA抗原的很强的T细胞应答。移植物的损伤由同种特异性效应T细胞介导，这些T细胞浸润在移植物中而启动移植排斥。Ⅰ类抗原主要激活细胞毒T细胞，而Ⅱ类抗原激活辅助和效应T细胞分泌炎性细胞因子。此外，供体的HLA抗原被受体APC细胞加工处理后递呈给受体$CD4^+$ T细胞，间接激活T细胞。由于移植物中的HLA抗原持续存在，可促使产生慢性排斥。

（一）实体器官移植

肾脏移植已经发展成为一项相对的常规项目，手术等技术失败率极低，而预防和/或处理移植物排斥反应是移植成功的主要障碍。首先要关注的是早期抗体介导的排斥反应，通常称为超急性排斥反应（hyperacute rejection）。确保供体和受体之间ABO血型相合，在移植前筛查是否存在HLA特异性抗体可防止其发生，也可在移植前作CDC交叉配合实验来鉴定移植是否具有超急性排斥的可能。

避免HLA不相合可促进移植肾的存活，减少急性排斥和对不相合抗原致敏的发生率。随着HLA位点不相合数的减少，移植肾的存活时间延长，其中最重要的是HLA-DR相合，其次是HLA-B和A，但移植10年后这3个基因座位对移植肾存活的作用是相同和累加的。1985年前，美国HLA相合肾脏移植的1年丢失率为17%，而A、B和DR位点有6个抗原不相合的移植1年丢失率为42%，两者相差25%。由于有效的免疫抑制剂的应用，HLA配型不佳所致的移植排斥明显下降，到了2001年，仅7%的HLA相合移植和12%的HLA不相合移植在1年后丢失。这个数字从1985年以来下降了4倍，但是不相合移植的丢失率仍然比相合移植高2倍左右。

HLA相合移植还有一个优点，可以减少受体被多个非己HLA表位的致敏。HLA相合较差的肾移植后，患者可变得高度敏感，可产生与50%以上供者发生反应的抗体。在这种情况下，一旦这些患者有必要进行第二次移植，寻找交叉配合阴性的供者更为困难。

在心和肺移植时，HLA相合也有一定的好处，特别是DR位点。由于冷

缺血时间、供体与受体之间的器官大小相适等因素更为重要，实际操作时很少考虑 HLA 的配型问题。HLA 兼容性在肝脏移植中的作用还没有明确，而角膜移植通常不受 HLA 配型的影响。

（二）造血干细胞移植

与造血干细胞移植结果相关的是编码 HLA-Ⅰ类和 HLA-Ⅱ类抗原的基因，供受者之间Ⅰ类的 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 基因，以及Ⅱ类的 HLA-DR 基因相合，可减少移植物排斥和急慢性移植物抗宿主病（GVHD）的发生率，提高存活率。供受者 HLA 相合程度与移植效果密切相关，HLA 等位基因（高分辨）相合优于低分辨相合。1988 年美国国家骨髓捐献计划（National Marrow Donor Program，NMDP）制定的选择供者最低标准为：HLA-A、B、DR 座位上的 6 个抗原中至少 5 个相合，简称 5/6 配合。虽然相合程度越高越好，但是使用 HLA 不相合供者并不是造血干细胞移植的禁忌，特别是对于高风险患者，在找不到 HLA 相合供者的情况下，放弃 HLA 不相合供者的移植可能使患者因延误移植时机而死亡，使用 HLA 半相同家庭成员供者是一项值得考虑的选择。

三、与输血的关系

多次接受输血的患者体内可产生抗-HLA 抗体，从而发生因白细胞或血小板受到破坏而引起的输血反应。临床输血反应中发热性非溶血性输血反应占 55%～75%，这些反应多数是由于抗 HLA 抗体破坏白细胞后释放出热原物质引起。抗 HLA 抗体引起的非溶血性输血反应表现为头晕、面红、恶心、寒战，体温可高达 39℃以上，严重者可并发肺部综合征，双肺出现干湿性啰音，X 线肺部有阴影，肺底浸润。由于联合化疗的广泛应用，需要输注血小板的患者越来越多。血小板制剂中难免残留淋巴细胞，而且血小板膜上也存在 HLA-A、B 抗原，故产生 HLA 免疫应答就难以避免。一旦产生 HLA 抗体，就可能导致随机供血者血小板输注无效等后果。

四、与法医学的关系

由于 HLA 具有高度的多态性，在无关个体之间 HLA 型别完全相同的几率极低，在法医学上可用于进行个体识别。另外，由于 HLA 的单元型遗传特点，使 HLA 分型成为鉴定亲子关系的重要手段。

第七章　超敏反应（变态反应）与免疫缺陷病

第一节　超敏反应（变态反应）

一般临床上所称超敏反应即Ⅰ型变态反应。变态反应为人类所认识迄今恰为100周年。1902年法国生理学家Charles在印度洋旅行时接触到一种海葵后，发生了全身荨麻疹。将该种海葵的提取物连续注入狗体内，狗出现喘息、烦躁不安、腹泻、吐血性物并迅即死亡。Richet认为这种现象是一种过敏反应，并提出过敏症（anaphylaxis）的名称。1906年，奥地利医师Clemens von Pirquet观察到注射破伤风抗毒素血清后一些人在再次注射这种血清时会出现强烈反应，严重者甚至会死亡。Pirquet将此种反应称为“变态反应（allergy)”，指机体第二次接触相同抗原后出现的改变了的反应。1966年，日本医学家石坂（Ishizaka）在豚草花粉过敏患者血清中发现IgE，使变态反应学的理论与临床取得了突破性的进展。随着近代医学、免疫学、分子生物学的迅速发展，对变态反应性疾病的认识进展迅速，观念不断更新。近十余年来世界范围内，尤其是在工业化程度较高的发达国家中过敏性疾病患病人数迅速增加，临床各科医师都有必要对过敏性疾病的理论及诊断方法有所了解，以提高对此类疾病的认识和诊治、研究水平。

一、概　　述

1. 变态反应与变态反应病的定义　变态反应的本质是体内出现的异常的免疫应答。抗原性物质进入体内引起机体发生免疫应答，其生物学效应包括两个方面：正免疫应答和负免疫应答，正免疫应答又分为正常的免疫应答和异常的免疫应答。正常的免疫应答是机体的生理性防御反应，异常的免疫应答则可引起组织损伤和生理功能紊乱。机体受同一抗原（或半抗原）物质再次刺激后产生的异常的、过于强烈的免疫应答即称之为变态反应。能引起异常免疫应答的环境中的抗原性物质称为变应原。如果引起免疫应答的物质是体内的自身物质，则称为自身抗原。变应原在通常情况下并不具有致病性，只有对过敏体质

的人才会引起变态反应。变态反应在临床上有多种类型的表现，以变态反应为主要发病机制的一类疾病称为变态反应病。

2. 变态反应的分型　根据免疫学发病机制的不同，一般将变态反应分为4型：Ⅰ型：速发型；Ⅱ型：细胞毒型或细胞溶解型；Ⅲ型：免疫复合物型；Ⅳ型：迟发型。各型变态反应的免疫效应因子和代表性疾病见表7-1。在4型变态反应中，只有Ⅰ型变态反应是IgE参与介导的。Ⅰ型变态反应的变应原通常是体外环境中的物质，在过敏体质者体内可诱导产生特异性IgE抗体。过敏体质又称为特应性（atopy）体质，对外源性变应原高度敏感，具有遗传倾向。一般所称超敏反应（hypersensitivity）常泛称为过敏反应（anaphylaxis）是指Ⅰ型变态反应，即狭义的变态反应。本章中所讨论的过敏性疾病即Ⅰ型变态反应所引起的疾病。

表7-1　4型变态反应的基本特点

型别	名称	免疫效应因子	补体	典型疾病
Ⅰ	速发型	IgE，IgG4	不参与	过敏性休克，支气管哮喘 过敏性鼻炎，荨麻疹
Ⅱ	细胞毒型 （细胞溶解型）	IgG，IgM	可能参与	输血反应，新生儿溶血病
Ⅲ	免疫复合物型	IgG	参与	急性：血清病，肾小球肾炎 慢性：SLE，RA
Ⅳ	迟发型	T淋巴细胞及细胞因子	不参与	传染性变态反应（结核、麻风） 移植排斥反应，接触性皮炎

3. 典型的变态反应病　临床各科疾病都可能涉及变态反应，许多疾病在病程的某一阶段上有变态反应因素参与。呼吸科、耳鼻喉科、皮肤科、儿科的变态反应病最为常见。患病率较高的典型的过敏性疾病（Ⅰ型变态反应病）有支气管哮喘、过敏性鼻炎（变应性鼻炎）、过敏性结膜炎、过敏性荨麻疹、过敏性皮炎（异位性皮炎）、过敏性胃肠炎、药物过敏反应及过敏性休克等。

二、免疫学检验

1. 血清总IgE测定　IgE即免疫球蛋白E，是Ⅰ型变态反应病发病机制中起主要作用的免疫分子，因而在超敏反应的免疫学实验诊断中是首选的检测项目。IgE是血清中浓度最低的免疫球蛋白，只有IgG血清浓度的大约万分之一。是半衰期最短的免疫球蛋白，只有2.8天，与细胞表面结合的IgE半衰期稍长，约为8～14天。IgE由变应原入侵部位（鼻咽、支气管、胃肠道）的黏膜固有层中的浆细胞合成，是合成率最低，分解率最高的免疫球蛋白，对热不

稳定，属于亲细胞抗体（亲同种细胞抗体）。脐血中 IgE 水平可用于评估婴儿过敏体质的可能性。

总 IgE 检测现通常用 ELISA 方法进行。由于血清 IgE 浓度很低，一般酶免疫实验方法的敏感性不足以检出血清 IgE。现常规检测 IgE 的试剂盒采用生物素-亲合素放大的 ELISA。试剂盒中所含用于制定标准曲线的 IgE 标准品和检测结果的 IgE 浓度单位与其他免疫球蛋白不同，不是用 mg/L 表示，而是用 IU（国际单位）/ml 表示。1IU=2.42ng。

［参考值］

血清总 IgE 水平在正常人群中呈偏态分布，即多数人为 0 或接近于 0，IgE 水平越高的人数越少。Pharmacia 公司应用其 UniCAP 系统检测正常成人几何平均值为 17.4kU/L，均值加 2 个标准差为 113kU/L。非过敏的正常成人有 84%低于 25kU/L；而过敏患者有 78%高于 100kU/L。因此血清总 IgE 水平难以划定参考值范围。结合临床表现，划定总 IgE 水平参考值有助于粗略地评估机体的过敏状况，商品试剂盒多以 150kU/L 为参考范围上限。

健康人群血清 IgE 水平与年龄关系较大，小儿的总 IgE 水平低于成人，老年人的血清总 IgE 水平又有所降低。种族、遗传因素及检测方法对 IgE 水平也有影响。按 Pharmacia 公司的提供的参考范围：1 个月以内小儿<12kU/L，1 岁<11kU/L，2～4 岁<33kU/L，5 岁以上至成人<85kU/L。

［结果分析与临床意义］

总 IgE 检测对于鉴别过敏与非过敏有一定意义。总 IgE 增高时，过敏性疾病可能性较大，但并不一定是过敏性疾病。非变态反应性疾病也可能升高，如寄生虫感染、支气管肺曲菌病、麻风、类天疱疮、肿瘤、IgE 型骨髓瘤、结缔组织病、免疫缺陷病、移植排斥反应等。上述疾病时 IgE 升高的程度不一致，在过敏性支气管肺曲菌病时最为显著，其值可达 2 000～8 000kU/L，寄生虫感染时血清总 IgE 水平也可高于 2 000kU/L。

有时血清总 IgE 水平检测结果呈参考范围内低值仍不能排除过敏性疾病的可能，需结合临床和血清特异性 IgE 检测结果进行判断。

2. 变应原检测的体内实验　环境中的变应原物质有成百上千种，包括吸入性、食入性、接触性、注入性等各种途径进入体内的小分子（分子量 1 万～7 万）抗原性物质。每个过敏体质者的变应原由于遗传素质的差异可能有所不同。因此每个过敏性疾病患者或过敏体质者进行过敏原检测对于自己的病因诊断、免疫治疗及预防都有重要意义。

体内实验是传统的检测过敏原的方法，包括皮肤实验（点刺实验、划痕实验、皮内实验、斑贴实验、皮窗实验、被动转移实验）、黏膜实验（眼结膜实

验、鼻黏膜实验、口腔黏膜实验、支气管实验、泌尿生殖系实验、直肠实验），激发实验（支气管、眼、鼻，药物、物理因素）等。最常用的方法是皮肤点刺实验（skin prick test，SPT），是使微量可疑变应原进入皮肤，如果出现皮肤反应判为阳性。多种常见变应原已有基因工程重组或纯化商品试剂供应。其优点是易于操作，临床相关性好，价格较低廉，适合我国国情，出结果快（15～20分钟），适用于药物过敏的快速检测。其缺点是用药后可能掩盖阳性结果，实验前1周须停用可抑制皮肤实验反应的药物如肾上腺糖皮质激素、抗组胺药物。有些疼痛感觉，尤其儿童不愿接受。有时结果分析具有主观性，某些严重过敏者可能出现强烈反应而有一定风险。激发实验和黏膜实验在临床诊断中较少使用，一般用于研究目的，主要用于排除诊断。

3. 变应原检测的细胞学实验　细胞学实验是一种体外实验方法，包括嗜碱性粒细胞脱颗粒实验和组胺释放实验。两种实验的原理大致相同，都是根据结合有变应原特异性IgE的嗜碱性粒细胞与再次入侵的变应原相遇后，嗜碱性粒细胞被活化而脱颗粒并释放组胺等一系列反应而建立的。方法是：采患者血抗凝，分离白细胞悬液（含嗜碱性粒细胞），与可疑变应原在体外混合，37℃温育30分钟后，直接在显微镜下观察嗜碱性粒细胞脱颗粒的情况。组胺释放实验的方法与嗜碱性粒细胞脱颗粒实验大致相同，只是在加入可疑变应原温育后加入苯乙甲醛，与释放的组胺发生缩合反应，用荧光分光光度计对组胺定量检测。

［参考值］

脱颗粒细胞＞30％为阳性，组胺释放率＞15％为阳性。

［结果分析与临床意义］

阳性结果提示实验所应用的可疑变应原是该患者的变应原。这两种实验由于操作较为繁琐，一般不用于临床常规检查，只用于对特殊变应原的鉴定。

4. 变应原检测的血清学实验

（1）变应原特异性IgE（specific IgE，sIgE）检测：sIgE检测是目前最常用的诊断变应原的体外实验方法。环境中能引起Ⅰ型变态反应的物质即变应原有很多种，每种变应原都能使对其过敏者体内产生过敏原特异性IgE。血清中特异性IgE的水平可反映个体对何种变应原过敏。由于血清特异性IgE水平比血清总IgE水平更低，需要应用专门的仪器设备进行检测。早先检测变应原特异性IgE的方法是Wide等于1967年建立的放射性变应原吸附实验（radio-allegosorbent test，RAST）。为了避免放射性物质的污染，近年有多种检测过敏原的商品化方法应用。如免疫荧光-酶技术（fluorescence-enzyme immunoassay，FEIA）、化学发光技术（chemiluminescence）等。FEIA为定量检测方

法，所应用的酶是β-半乳糖苷酶，底物是4-甲基伞桂-β半乳糖苷，其中含有荧光物质。检测血清或其他样本中变应原特异性IgE时敏感性可达0.35kU/L。以免疫印迹和免疫层析原理为基础的半定量检测sIgE的方法敏感性较FEIA略低，由于相对价格比较低廉现也广泛应用。体外血清学实验只需要少量血清即可进行多种变应原检查，结果准确，可定量或半定量，不受药物影响，对患者安全，痛苦小，适合于儿童。Pharmacia公司的CAP系统现多被认为是检测sIgE的特异性和敏感性都较高的方法。其缺点是试剂及相应仪器价格都过于昂贵，实验及报告时间约需数小时至一天。某些小分子变应原（药物、化工原料）尚无体外变应原检测商品试剂，也难以用常规方法进行检查。

环境中常见的变应原包括以下类别：

1）寄生虫和微生物：各种螨类（屋尘螨、粉尘螨等），各种真菌（点青霉、烟曲霉、分支孢霉、交连孢霉等），蟑螂等。

2）植物花粉：各种草花粉（豚草、葎草、蒿），各种树花粉（桑树、柏树、悬铃木、桦树、榆树、栎树、柳树、杨树等）。

3）动物毛屑：猫、狗、马、鸽子等动物的毛和皮屑。

4）食物：鸡蛋白；牛奶；鱼，虾，蟹，贝；牛肉，羊肉；坚果（腰果、花生、核桃）；瓜果（芒果、菠萝、西红柿、猕猴桃）；蔬菜（胡萝卜、芹菜、花椰菜）；豆类（大豆、蚕豆）谷物（小麦、荞麦）及其他多种食物。

5）药物：青霉素、非甾体抗炎药等。

6）接触类物质：乳胶，油漆，洗涤剂，金属（镍、钴、铬、金）等。

7）化工材料：甲醛，柴油颗粒等。

[参考值]

不过敏者sIgE应<0.35kU/L。

[结果分析与临床意义]

按照血清sIgE的浓度分为6级。级别越高，过敏程度越严重（表7-2）。

表7-2 特异性IgE的分级标准

级别	sIgE浓度（kU/L）	临床意义
0	<0.35	不过敏或可疑
1	0.35～	轻度
2	0.70～	轻中度
3	3.5～	中度
4	17.5～	中重度
5	50～	重度
6	>100	极重

（2）变应原特异性 IgG4 检测：IgG 是人体内含量最高的免疫球蛋白，能通过胎盘，广泛存在于血液和组织液中。大多数抗体活性来自 IgG。根据 γ 链抗原性的差异 IgG 可分为 4 个亚类，即 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，各亚类含量分别占 IgG 总量的 65%、23%、8%、4%（16∶6∶2∶1）。有些变应原进入体内后可使过敏体质者产生针对该变应原的特异性 IgG4 抗体，亦可与肥大细胞或嗜碱性粒细胞结合发生脱颗粒效应，但其引起的变态反应效应比 IgE 所引起的轻。有些过敏体质者在食用某些食物后出现过敏反应，其血清内针对该食物的变应原特异性 IgG4 水平增高，但不能检出变应原特异性 IgE。这类过敏反应一般出现较慢，约在食入变应原数小时后才发生，主要表现为皮疹或皮肤水肿。有些非过敏性疾病也会出现 IgG4 明显增高，如肠道寄生虫病、自身免疫性胰腺炎等。现有多种商品试剂盒检测变应原特异性 IgG4。

［参考值］

非过敏体质者 IgG4 应＜0.7g/L（ELISA 法），不过敏者过敏原特异性 IgG4 应为阴性。

5. 补体　补体是体内一类具有酶活性的蛋白，在机体固有免疫中发挥重要作用。补体不参与 IgE 介导的Ⅰ型变态反应。但在体内有免疫复合物参与的其他免疫反应中，补体活化所产生的裂解产物如 C3a 和 C5a 具有很强烈的血管活性作用，能引起局部水肿，因而称为过敏毒素。蛇毒、蜂毒毒素引起的过敏反应中 C3a 和 C5a 是引起病理改变的主要炎性介质。补体第一组分 C1 的抑制因子 C1-INH（又称 C1 酯酶抑制物）具有抑制补体过度活化的功能。有些患者由于先天性 C1-INH 缺乏，可发生遗传性血管神经性水肿（HAE），是一种遗传性疾病，表现为急性发作的全身及喉头水肿。这些表现很难与Ⅰ型过敏反应鉴别，故列为过敏反应的免疫学实验检查项目之一。单个补体组分已有商品化的抗体试剂或试剂盒供应，常用速率散射比浊法进行检测。

［参考值］

C1-INH 0.15～0.30g/L（比浊法），低于参考值 50% 为异常（国内报道）。C3a 222～940g/L，C5a 2.7～12.8g/L。

6. 炎症标志物　环境中的变应原所引起的Ⅰ型变态反应可分为两个阶段：即刻相反应（immediate phase reaction，IPR）和迟发相反应（late phase reaction，LPR）。即刻相反应由肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的Ⅰ型高亲和力 IgE 受体（FcεRⅠ）介导，主要释放组胺，1～2 分钟内发生，持续时间短暂约 30～60 分钟，如青霉素过敏性休克。迟发相反应由Ⅱ型低亲和力 IgE 受体（FcεRⅡ，即 CD23）介导，其启动细胞是肥大细胞，反应过程中嗜酸性粒细胞发生脱颗粒反应，产生多种生物活性介质、酶、细胞因子，引起组织损伤和

功能障碍。Ⅰ型变态反应性的迟发相反应阶段称为Ⅰ型变态反应性炎症，又称嗜酸性粒细胞性炎症。其主要病理改变为毛细血管通透性增强、小血管扩张、平滑肌收缩、腺体分泌增加、嗜酸性粒细胞增多和浸润等持续性组织损伤。在Ⅰ型变态反应性炎症过程中产生多种炎性介质。已在临床应用作为变态反应性炎症标志物的是嗜酸性粒细胞分泌的嗜酸性粒细胞阳离子蛋白和肥大细胞分泌的类胰蛋白酶。

（1）嗜酸性粒细胞阳离子蛋白（eosinophil cataonic protein，ECP）：每个嗜酸性粒细胞胞浆中含有约 200 个颗粒，在Ⅰ型变态反应性炎症时可释放多种毒性蛋白，包括：ECP、嗜酸性细胞过氧化物酶（EPO）、主要碱性蛋白（MBP）、嗜酸性细胞蛋白 X/嗜酸性细胞衍生的神经毒素（EPX/EDN）。其中 ECP 最常用做Ⅰ型变态反应性炎症标志物。ECP 与Ⅰ型变态反应迟发相反应关系密切，血清中 ECP 水平反映嗜酸性粒细胞的活化情况及Ⅰ型变态反应性炎症的程度，有助于明确诊断，判断病情，估计预后，指导并监测用药，如糖皮质类固醇的应用。

检测 ECP 的方法与检测变应原特异性 IgE 的方法相同，也是应用荧光-酶免疫检测方法和仪器。由于其血清含量甚低（g/L 水平），检测过程中必须严格控制实验条件，包括采血用的试管、凝血的温度与时间等。血清是最常用的检测材料，肺泡灌洗液和诱导痰中的 ECP 水平也可作为临床观察和研究的内容。

［参考值］

按仪器试剂所附参考值，正常成人血清 ECP<15μg/L。但国内外文献报道有差别，用 SST 管采血，用 UniCAP 系统检测，正常人 ECP<8μg/L。另有报道在 37℃条件下凝血并分离血清，正常人 ECP 的几何均数是 17.8μg/L，血清 ECP 的正常值为<70μg/L（95%的可信限）。治疗前后、病情活动期与缓解期的 ECP 测定值比较比单次检测的数值更有意义。

（2）类胰蛋白酶（tryptase）：组织中的肥大细胞是介导Ⅰ型变态反应性炎症的主要细胞。肥大细胞胞浆中也有大量颗粒，在肥大细胞活化时其胞浆颗粒也可释放多种炎性介质和酶。类胰蛋白酶是肥大细胞内预先合成的中性蛋白酶。类胰蛋白酶相对分子质量为 134 000，由 4 个非共价结合的亚单位组成四聚体结构，四个亚单位有共同的抗原性。根据分子结构可将类胰蛋白酶分为 3 种，即 α-、β-、γ-或称跨膜类胰蛋白酶。三种同源性>98%，提示可能为等位基因的变异体。

在Ⅰ型变态反应性炎症过程中，肥大细胞脱颗粒而将类胰蛋白酶和其他炎性介质释放出细胞外，引起Ⅰ型变态反应性炎症的各种效应和过敏反应的各种临床表现。类胰蛋白酶是肥大细胞释放的独特的酶，因而可以作为肥大细胞被

激活的标志物，有助于过敏性疾病的鉴别诊断。

检测方法与 ECP 相同，也是应用荧光-酶免疫检测法和仪器。

[参考值]

仪器试剂所附参考值（厂家提供）的参考值上限为 13.5μg/L。

[结果分析与临床意义]

国内报道健康志愿者水平为 4.36±2.55μg/L，以 8.25μg/L 作为正常值上限，特异性和敏感性分别为 92.3%和 94.1%。年龄和性别对类胰蛋白酶水平无明显影响。

类胰蛋白酶在严重全身性过敏反应急性期如急性药物过敏及过敏性鼻炎、过敏性哮喘等疾病中均增高，但在慢性荨麻疹等非急性疾病并不增高，可作为严重过敏反应的血清标志物。类胰蛋白酶水平与总 IgE 并无显著相关。类胰蛋白酶明显增高时尚需排除其他疾病，如肥大细胞增多症等。

（3）组胺：组胺是Ⅰ型变态反应性炎症早期嗜碱性粒细胞释放的主要炎性介质，血中浓度反映嗜碱性粒细胞活化的程度。血液中组胺水平的检测可用多种方法进行，商品化的酶免疫试剂盒已有供应，所用实验材料为血浆。但由于组胺在血浆中的半衰期很短，影响因素较多，故组胺水平一般不作为Ⅰ型变态反应临床检测的指标。文献中一般是将患者血浆组胺水平与正常健康人血浆组胺水平进行比较。

（4）花生四烯酸代谢产物（前列腺素和白三烯）：在Ⅰ型变态反应的启动过程中，嗜碱性粒细胞和肥大细胞表面发生桥联反应，膜磷脂水解释放出花生四烯酸。花生四烯酸为廿碳不饱和脂肪酸，在代谢过程中通过环氧合酶途径生成前列腺素（prostaglandin，PG），通过脂氧合酶途径生成白三烯（leukotriene，LT）。白三烯可分为 LTB4、LTC4、LTD4、LTE4，前列腺素可分为 PGD2、PGE2 等。前列腺素和白三烯都是在Ⅰ型变态反应过程中新合成的介质，其血清水平反映过敏反应的强烈程度。当血样中前列腺素和白三烯水平明显增高时，提示强烈的过敏反应存在，可为过敏性休克猝死的法医学鉴定提供有价值的依据。检测前列腺素和白三烯的酶免疫试剂盒已有供应，但样本需经预处理，检测过程较为繁琐。一般也不作为Ⅰ型变态反应临床检测的指标。文献中也是将患者血清前列腺素和白三烯水平与正常健康人进行比较。

第二节 免疫缺陷病

免疫缺陷病（immunodeficiency diseases）是一组由于免疫系统某个或某些环节异常所致的免疫功能不全而引起的疾病。患者易于发生各种感染，反复

频繁发作，病情严重或呈慢性持续状态。免疫缺陷患者不仅可能发生细菌感染，还可能发生真菌、病毒、寄生虫感染，恶性肿瘤的发生率也较高。如果新生儿、儿童或成人反复发生严重感染或持续感染，对抗生素治疗无明显效果时，应考虑免疫缺陷或免疫低下，并采取正确的免疫学检查方法进行诊断。

［概述］

免疫缺陷病按发生原因可分为原发性和继发性两大类。

1. 原发性免疫缺陷病　原发性免疫缺陷病（primary immunodeficiency diseases，PID）是先天性的，出生时就存在的疾病，常伴有组织器官的发育畸形，故又称为先天性免疫缺陷病（congenital immunodeficiency disease）。PID 多数为遗传性缺陷引起的，遗传方式多为 X 连锁隐性遗传或常染色体隐性遗传。严重的免疫缺陷病常危及生命，患者不能生长到成年即死于各种感染，故多见于婴幼儿。PID 可发生于免疫系统发育成熟的各个环节，免疫系统中任何一个成分（免疫细胞或免疫分子）缺失或功能不全所致的免疫功能障碍都可引起免疫缺陷病。免疫系统信号传导障碍也可引起免疫缺陷病。1952 年 Ogden C Bruton 首次报道了第一例 PID，其后陆续发现了多种由于不同免疫环节障碍所引起的 PID。近年来随着分子遗传学的进展，对 100 余种 PID 的基因缺陷基础有了更清楚的了解。从 1970 年开始，世界卫生组织（WHO）设立了专门委员会对各种 PID 进行命名。此后每 2～3 年由国际免疫学联盟（International Union of Immunological Societies，IUIS）组织专家委员会对命名进行更新。按免疫系统缺陷发生部位分类，PID 分为 5 大类，最多见的是抗体免疫缺陷，约占 PID 的 50%，其他为细胞免疫缺陷（20%）、联合免疫缺陷（细胞免疫和体液免疫联合缺陷）（18%）、吞噬细胞缺陷（10%）和补体系统缺陷（2%）。2003 年在葡萄牙 Sintra 举行的专家委员会会议对免疫缺陷的分类做了较大的调整，2005 年在匈牙利布达佩斯举行的专家委员会会议又在上次会议的基础上做了补充。每种疾病都标明了其致病相关基因。

随着人类基因组计划的进展，高通量测序方法的建立和完善，生物信息学方法在基因组学研究中的应用，在免疫系统中起重要作用的新基因不断被发现，PID 分类和命名将会有更多的改进。

2. 继发性免疫缺陷病（secondary immunodeficiency disease，SID）　继发性免疫缺陷病是出生后由于某些原因导致的免疫功能低下，常见原因包括物理因素（如放射线照射），化学因素（如免疫抑制剂和某些抗生素的应用），生物因素（如病毒感染）等，营养不良、大型外科手术或创伤引起的蛋白合成不足或消耗过多、肿瘤、脾切除、中毒等病理状况及妊娠、老年等生理状态也是发生继发性免疫缺陷的常见原因。

继发性免疫缺陷病远比 PID 常见，发病者不局限于儿童，但免疫缺陷的程度较轻，常常只表现为不同程度的免疫功能低下，多数是暂时性的，消除病因后能够恢复。相对于 PID，继发性免疫缺陷较易纠正。但放射线照射引起的造血系统损害往往是不可逆的，吞噬细胞及淋巴细胞长期处于低下水平，难以纠正。人免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）引起的继发性免疫缺陷称为获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome，AIDS），属于感染性疾病，也可列为特殊类型的继发性免疫缺陷病，是由于 $CD4^+$ T 淋巴细胞受到病毒的持续性损伤所致。

［分类］

2003 年 IUIS 专家委员会将原发性免疫缺陷病分为 8 类。2005 年又在此基础上做了更新。

1. T 细胞和 B 细胞免疫缺陷

（1）无 T 细胞、有 B 细胞的严重联合免疫缺陷病（severe combined immunodeficiency，SCID）：γ 链缺陷、Jak3 缺陷、IL-7Rα 缺陷、CD45 缺陷、CD3δ/CD3ε 缺陷。

（2）无 T 细胞、无 B 细胞的严重联合免疫缺陷病：RAG1/2 缺陷（RAG：recombination-activating gene，重组激活基因）、DCLRE1C 缺陷（Artemis 缺陷，DNA 重组酶修复蛋白缺陷），ADA（adenosine deaminase；腺苷脱氨酶）缺陷、网状组织发育不全。

（3）Omenn 综合征：IgE 增加，其他免疫球蛋白减少。嗜酸细胞增加，淋巴结及肝脾大。

（4）DNA 连接酶Ⅳ缺陷：T、B 淋巴细胞都减少，各类免疫球蛋白减少，表现为小头畸形，面部营养不良，对放射线敏感。

（5）CD40 配体缺陷：IgM 增加或正常，其他免疫球蛋白减少。中性粒细胞、血小板减少，溶血性贫血，胆道和肝脏疾病，机会感染。

（6）CD40 缺陷：IgM 增加或正常，其他免疫球蛋白减少。中性粒细胞减少，胃肠道和肝脏疾病，机会感染。

（7）PNP（purine nucleoside phosphorylase，嘌呤核苷磷酸化酶）缺陷：T 细胞进行性减少，B 细胞正常。自身免疫性溶血性贫血，神经系统损害。

（8）MHCⅡ类分子缺陷：T 细胞数量正常，$CD4^+$ T 细胞减少，B 细胞正常。MHCⅡ类蛋白的转录因子基因（C2TA、RFX5、RFXAP、RFXANK）突变。

（9）CD3γ 缺陷：T 细胞数量正常，TCR 表达减少。

（10）CD8 缺陷：$CD8^+$ T 细胞减少，$CD4^+$ T 细胞正常，B 细胞正常。

（11）ZAP-70（70 000 的 zeta associated protein）缺陷：$CD8^+$ T 细胞减少，$CD4^+$ T 细胞正常，B 细胞正常。ZAP-70 信号激酶缺陷。

（12）TAP-1/2（transporter associated with antigen processing，抗原处理相关转运体）缺陷：$CD8^+$ T 细胞减少，$CD4^+$ T 细胞正常，B 细胞正常。TAP-1 或 TAP-2 基因突变。表现为血管炎。

（13）翼状螺旋缺陷（winged helix deficiency）。FOX N1 基因编码的叉头框（forkhead box，Fox）N1 转录盒缺陷。外周血 T 细胞明显减少。表现为秃顶症，胸腺上皮异常。

2. 抗体缺陷为主的免疫缺陷病

（1）缺少 B 细胞，各类免疫球蛋白都严重减少的免疫缺陷：表现为严重的细菌感染。包括：BTK（Bruton tyrosine kinase，酪氨酸激酶）缺乏，即性连锁无丙种球蛋白血症；重链缺失；轻链缺乏；BLNK（B-cell linker protein，B 细胞连接蛋白）缺乏；伴免疫缺陷的胸腺瘤。

（2）B 细胞数量正常或降低，至少两类免疫球蛋白严重减少的免疫缺陷：IgG 和 IgA 减少，IgM 正常。表现为反复感染，可能有自身免疫、淋巴增生或肉芽肿病。包括：普通易变型免疫缺陷（common variable immunodeficiency，CVID）；可诱导共刺激因子（inducible costimulator，ICOS）缺乏；CD19 缺乏；TACI（transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor）缺乏、BAFF（B-cell activating factor of TNF family，肿瘤坏死因子家族的 B 细胞活化因子）受体缺乏。

（3）B 细胞数量正常、IgG 和 IgA 严重减少、IgM 升高的免疫缺陷：表现为淋巴结肿大，生发中心扩大。包括：活化诱导的胞嘧啶脱氨酶（activation-induced cytidine deaminase，AID）缺乏、尿嘧啶 DNA 糖基化酶（uracil-DNA glycosylase，UNG）缺乏。

（4）B 细胞数量正常、1 类免疫球蛋白或轻链缺乏：重链缺失（染色体 14q32 缺失，可能 IgG1、IgG2、IgG4、IgA1、IgE 缺乏，无症状）；κ 轻链缺乏（各类免疫球蛋白轻链都是，无症状或反复细菌、病毒感染），IgG 亚类缺乏（一种或多种 IgG 亚类减少），IgA 缺乏伴 IgG 亚类缺乏（无症状或反复感染，对糖类抗原或变应原应答低下或自身免疫病），选择性 IgA 缺乏（可能发展为 CVID）。

（5）B 细胞数量正常、免疫球蛋白浓度正常、特异性抗体缺乏：不能形成针对特异性抗原的抗体。

（6）婴儿期暂时性低丙种球蛋白血症：反复轻度细菌感染。

3. 其他已确认的免疫缺陷综合征（other well-defined immunodeficiency

syndromes)

(1) Wiscott-Aldrich 综合征：性连锁遗传。T 细胞进行性减少，B 细胞正常。IgM 减少，对多糖抗原的抗体减少，IgA 和 IgE 增加。表现为血小板减少、湿疹、淋巴瘤、自身免疫病、细菌感染。

(2) DNA 修复缺陷：常染色体隐性遗传，IgA、IgE、IgG 亚类增加，IgM 单体增加。包括共济失调毛细血管扩张症（ataxia-telangiectasia）：甲胎蛋白可能增加；共济失调样综合征（ataxia-like syndrome）：核酸酶 MRE-11 基因突变，对放射线敏感性增加；Nijmegen breakage 综合征：小头畸形、淋巴瘤；Bloom 综合征：解螺旋酶（helicase）缺陷，白血病、淋巴瘤、光过敏、毛细血管扩张。

(3) 胸腺缺陷（thymic defect）：DiGeorge 异常（DiGeorge anomaly）：常染色体显性遗传，22q11 部分单体，甲状旁腺功能低下，异常面容。

(4) 免疫性骨发育不良：常染色体隐性遗传。软骨毛发发育不良：RMRP（RNA component of mitochondrial RNA-processing endoribonuclease）基因突变，短肢矮小、干骺端软骨发育不全。Schimke 综合征：SMARCAL1 基因突变，子宫内发育迟缓，肾病。

(5) Hermansky-Pudlak syndrome2 型：常染色体隐性遗传，T、B 淋巴细胞数量正常，细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞活性低下，易出血体质。

(6) 高 IgE 综合征：又称 Job-Buckley 综合征，常染色体隐性或显性遗传，以 IgE 抗体水平明显增高为特点，反复发生葡萄球菌感染，假丝酵母菌感染亦多见，感染发生部位多见于皮肤、肺、关节等部位。骨质疏松，易出现脊柱侧凸，反复发生骨折。常有流涕、哮喘、湿疹等过敏症状。常染色体隐性或显性遗传。宽鼻梁，面部不对称。

(7) 慢性黏膜皮肤假丝酵母菌病。

4. 免疫失调病（disease of immune dysregulation）

(1) 伴有白化病的免疫缺陷：常染色体隐性遗传，T、B 淋巴细胞数量正常，CTL 细胞和 NK 细胞活性低下。包括：Chediak-Higashi 综合征，Griscelli综合征 2 型。

(2) 家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增生症：常染色体隐性遗传，T、B 淋巴细胞数量正常，CTL 细胞和 NK 细胞活性低下。表现为严重炎症。包括：穿孔素（perforin）缺乏，Munc 13-D 缺乏，syntaxin 11 缺乏。

(3) 性连锁淋巴增生综合征（X-linked lymphoproliferative syndrome，XLP）：EB 病毒感染引起的免疫异常，如肝炎、再生障碍性贫血、淋巴瘤。

(4) 伴有自身免疫的综合征：自身免疫淋巴增生综合征（autoimmune

lymphoproliferative syndrome，ALPS)，T 细胞数量正常，$CD4^-CD8^-$细胞增加。分为 4 型：1a 型：CD95（Fas）缺陷，1b 型：CD95L（Fas 配体）缺陷，2a 型：caspase 10 缺陷，2b 型：caspase 8 缺陷（caspase 是执行细胞凋亡的主要酶类）。APECED（autoimmune polyendocrinopathy with candidiasis and ectodermal dystrophy)，即伴有白色假丝酵母菌病和外胚层营养不良的自身免疫性多内分泌腺病：T 细胞数量正常，$CD4^+$细胞增加。IPEX（immune dysregulation，polyendocrinopathy，enteropathy，X-linked)，性连锁免疫失调多内分泌腺病和肠病：T 细胞数量正常，缺少 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$调节性 T 细胞。除 IPEX 外均为常染色体显性遗传。

5. 吞噬细胞数量和功能先天性缺陷

(1)～(3) 严重先天性中性粒细胞缺乏症：弹性蛋白酶排出障碍，弹性蛋白酶表达抑制，粒细胞集落刺激因子受体（G-CSFR）缺陷。

(4) Kostmann 综合征（先天性粒细胞减少)。

(5) 周期性中性粒细胞减少症。

(6) X 连锁中性粒细胞减少症伴骨髓发育不良。

(7) 1 型白细胞粘附缺陷（leukocyte adhesion deficiency，LAD)：粘附蛋白（adhesion protein）缺陷。

(8) 2 型白细胞粘附缺陷：GDP 岩藻糖转运子（GDP-fucose transporter）缺陷。

(9) 3 型白细胞粘附缺陷：整合素 Rap1 活化（Rap1-activation of integrins）缺陷（Rap 是一种 GTP 酶)。

(10) Rac 2 缺陷：肌动蛋白细胞骨架调节（regulation of actin cytoskeleton）缺陷。

(11) β 肌动蛋白（actin）缺陷：细胞浆肌动蛋白缺陷。

(12) 局限性青少年牙周病。

(13) Papillon-Lefevre 综合征：CTSC（cathepsin C activation of serine proteases）缺陷，丝氨酸蛋白酶活化组织蛋白酶 C 缺陷。

(14) 特殊颗粒缺乏：髓样转录因子（myeloid transcription factor）缺陷。

(15) Schwachman-Diamond 综合征：遗传性再生障碍性贫血，胰腺分泌功能不全所致全血细胞减少。

(16) 性连锁慢性肉芽肿病（X-chronic granulomatous disease，X-CGD)。

(17)～(19) 常染色体慢性肉芽肿病（不同基因缺陷所致)。

(20) 中性粒细胞 G-6-PD 缺陷（G-6-PD：葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)。

(21) IL-12、IL-23 受体 1 链缺乏。

(22) IL12 p40 亚单位缺乏。

(23) γ干扰素受体1缺乏。

(24) γ干扰素受体2缺乏。

(25) STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1，信号传导蛋白和转录激活因子) 缺陷。

6. 天然免疫缺陷 (defects in innate immunity) 伴免疫缺陷的外胚层止汗机制发育不良 (anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency，EDA-ID)，IL-1受体相关激酶4 (IL-1 receptor-associated kinase 4，IRAK4) 缺陷，WHIM综合征：疣、低丙种球蛋白血症、感染、myelokathexis (warts，hypogammaglobulinemia，infections，myelokathexis)，疣状表皮发育不良，成熟骨髓细胞凋亡伴中性粒细胞减少，趋化因子受体CXCR4基因缺陷。

7. 自身炎症性疾病 (autoinflammatory disorders) 家族性地中海发热，肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征 (TNF receptor-associated periodic syndrome，TRAPS)，高IgD综合征，Muckle-Wells综合征，家族性冷性自身炎症综合征，新生儿发作性多系统炎性疾病 (neonatal onset multisystem inflammatory diseases，NOMID) 或慢性婴儿神经关节综合征 (chronic infantile neurologic cutaneous syndrome，CINCA)，无菌性化脓性关节炎-脓皮病-坏疽-痤疮综合征 (pyogenic sterile arthritis，pyoderma，gangrenosum，acne，PAPA)，Blau综合征 (眼色素膜炎、关节肉芽肿性滑膜炎、皮疹、克罗恩病)。

8. 补体缺陷 C1q、C1r、C4、C2、C3、C5、C6、C7、C8α、C8β、C1抑制因子、I因子、H因子、D因子、P因子 (备解素)、甘露糖结合蛋白 (mannose binding protein，MBP)、甘露糖结合蛋白相关的丝氨酸蛋白酶2 (MBP-associated serine proteanse，MASP2) 缺陷。

[诊断]

免疫缺陷病的诊断原则包括三个层次：①免疫缺陷病存在；②免疫缺陷病的分类：原发性或继发性；③发生免疫缺陷的环节位置和免疫缺陷病的具体名称。

免疫缺陷病的诊断目的包括：①早期对患者明确诊断，给予正确治疗并判断预后；②产前诊断，早期发现存在免疫缺陷的异常胚胎，及早终止妊娠。

免疫缺陷病的诊断方法包括临床诊断和辅助诊断 (辅助检查和实验室检查) 两个方面。临床诊断包括病史、个人史 (包括预防接种史)、家族史、既往史、起病年龄等。病史包括各种临床表现，如感染的部位、程度、病程、病原体的种类等。

以下临床表现提示可能存在某种原发性免疫缺陷病：肝脾大、儿童发育迟

缓、毛细血管扩张、共济失调、湿疹、血小板减少、白化病、短臂侏儒、软骨及毛发发育不全、手足搐搦等。

免疫缺陷最主要的表现和共同的特点是感染。呼吸道、鼻窦、中耳、皮肤、黏膜等部位的严重感染、持续慢性感染或反复感染，少见病原体的感染，难治性感染都可能是免疫缺陷的表现。消化道感染表现为慢性腹泻。

免疫缺陷病患者对外源性病原体的易感性明显增加，反复发作，难以治愈，常常是患者死亡的主要原因。不同类别、不同病因引起的免疫缺陷病的易感病原体、感染部位、临床表现有所不同。抗体缺陷者多发生细菌性感染，以化脓性细菌感染为主，如葡萄球菌、链球菌和肺炎球菌等，表现为鼻窦炎、中耳炎、肺炎、化脓性脑膜炎、败血症等。吞噬细胞缺陷者多发生葡萄球菌和大肠杆菌引起的感染。补体缺陷时可能有脑膜炎球菌和淋病奈瑟菌感染。细胞免疫缺陷患者则较多发生病毒或其他细胞内寄生物如真菌、放线菌、结核杆菌和其他少见微生物感染。联合免疫缺陷时则以化脓菌为主，有时合并胞内寄生性病原体感染，表现为全身重症细菌及病毒感染，顽固性腹泻或脓皮病等。不同免疫缺陷病的临床表现复杂多样，并可同时累及多系统多器官。同一疾病的不同患者亦可能有不同的临床表现，给诊断带来困难。免疫缺陷病患者，尤其是T细胞免疫缺陷者易发生恶性肿瘤和自身免疫病，恶性肿瘤的发病率可达同年龄正常人群的100～300倍。

不论是儿童或成人，如反复发生严重或罕见病原体的感染均应考虑免疫缺陷病。发生在幼儿的免疫缺陷病通常是遗传性的，询问家族史并进行家系调查可能发现重要线索。在一般情况下非致病的或条件致病的微生物（如卡氏肺囊虫或巨细胞病毒）感染高度提示免疫缺陷的存在。

发病年龄是原发性免疫缺陷的重要特点。原发性免疫缺陷多发生在儿童，在婴儿或儿童期即开始出现反复感染。6个月以下婴儿多为T淋巴细胞缺陷，较大年龄的儿童则可能有抗体缺陷。免疫缺陷的婴儿常发生严重的细菌感染，迁延不愈，反复出现，如鼻窦炎、中耳炎、慢性支气管炎及肺炎。皮肤和黏膜的感染常出现在口、眼和生殖器等部位。鹅口疮是口腔黏膜真菌感染所致，胃肠道感染可引起慢性腹泻、腹胀和体重下降。

对成人反复发生的慢性感染一般首先考虑继发性免疫缺陷。根据病史，是否有用药史、辐射或毒物接触史和手术史（如脾切除、扁桃体切除或阑尾切除）可推测继发性免疫缺陷的存在。不洁性史和静脉注射毒品史对诊断HIV感染很重要，感染了HIV的母亲可能通过母婴传播途径感染婴儿。

原发性免疫缺陷病

1. 联合免疫缺陷病

(1) 严重联合免疫缺陷病（severe combined immunodeficiency，SCID）：

1）常染色体隐性遗传的 SCID：因 1958 年在瑞士首先报道，故又称瑞士型免疫缺陷。现已证实是若干种基因先天性缺陷所致。可再分为无 T 细胞有 B 细胞和无 T 细胞无 B 细胞两类。二者外周血 T 细胞都明显降低，但前者外周血有 B 细胞存在而免疫球蛋白水平明显降低，如细胞内激酶 JAK3 基因突变；后者外周血 B 细胞也降低，如重组激活基因 RAG1 或 RAG2 突变。此类患儿胸腺很小，出生后频繁发生的中耳炎、肺炎、败血症、腹泻、皮肤化脓性感染或白色假丝酵母菌感染，接种活疫苗后发生全身性严重疫苗反应。实验室检查：淋巴细胞总数$<1.2\times10^9$，$CD3^+$细胞$<10\%$。对有丝分裂原反应极低，接受抗原刺激后不能产生特异性抗体。

2）性连锁隐性遗传的 SCID：属于无 T 细胞有 B 细胞的 SCID。白细胞介素受体 γ 链基因突变所致。IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21 的受体都有一条相同的 γ 链，其编码基因突变会导致 T 细胞成熟障碍。临床表现与免疫学实验室检查与上述常染色体隐性遗传 SCID 相同。

3）腺苷脱氨酶（ADA）缺陷：ADA 主要存在于淋巴细胞中。20 号染色体（20q13）上 ADA 编码基因突变可导致 ADA 缺陷，使淋巴细胞中脱氧腺苷代谢和 DNA 合成受到抑制，因而淋巴细胞数量明显减少，T 细胞、B 细胞功能障碍。常染色体隐性遗传，临床表现除感染外尚有骨骼系统发育异常。实验室检查：外周血中 T 细胞、B 细胞数量随年龄增长进行性减少，各类免疫球蛋白降低。

4）网状组织发育不全（reticular dysgenesis）：造血干细胞缺陷所致淋巴细胞、粒细胞、血小板减少。实验室检查：外周血中 T 细胞、B 细胞及白细胞总数均明显减少，各类免疫球蛋白水平均接近于 0 不能检出。

(2) 性连锁高 IgM 综合征：CD40 配体基因突变所致。患者 T 细胞表面缺少 CD40 配体（CD40L），而 CD40 配体与 CD40 的结合是使 B 细胞获得实现免疫球蛋白类别转换信号的必要条件，因而浆细胞中合成的 IgM 不能转化为其他类别的免疫球蛋白。2005 年布达佩斯会议将此病列为无 T 细胞无 B 细胞的 SCID 之一。发病者均为男性，临床表现为反复感染、口腔溃疡、肝脾大，中性粒细胞减少，血小板减少，溶血性贫血等。实验室检查：外周血 IgM 水平正常或增高，IgG、IgA 不能检出。T 细胞 CD40L 不能检出。

(3) 嘌呤核苷磷酸化酶（PNP）缺陷：PNP 是参与嘌呤代谢的酶，14 号染色体（14q13.1）上 PNP 的编码基因突变可导致 PNP 缺陷，正常的嘌呤代谢通路不能进行，毒性代谢产物（如 dGTP）大量堆积，使 T 淋巴细胞的增殖受到严重抑制。临床表现为反复感染、慢性腹泻等。实验室检查：外周血中 T

细胞进行性减少，对有丝分裂原反应性很低，血、尿中尿酸含量明显减少，各类免疫球蛋白正常或稍降低，红细胞溶解产物中不能检出 PNP 活性。

2. 抗体缺陷病　在各类原发性免疫缺陷病中，抗体缺陷是最常见的。其感染的病原体主要是化脓性球菌。如得到正确治疗，可维持生命多年，故可见成年人患者。

（1）BTK 缺陷：即最早发现的免疫缺陷病 Bruton 病，又称性连锁无丙种球蛋白血症（X-linked. agammaglobulinaemia，XLA）。与 B 细胞酪氨酸激酶（B cell tyrosine kinase，BTK）的编码基因 BTK 突变有关，故现称 BTK 缺陷。该基因位于 X 染色体长臂（Xq21. 3-22）。主要临床表现为反复、严重的化脓性感染。实验室检查：IgG<2g/L，IgA 和 IgM 不能检出。T 细胞数量正常，对有丝分裂原反应正常，B 细胞数量减少。可用分子生物学方法进行基因诊断，包括点突变、片段缺失和重复序列插入的检测。

（2）普通易变型免疫缺陷病（common variable immunodeficiency disease，CVID）：病因多种多样，多由于 T 细胞信号传导障碍，导致 B 细胞不能产生抗体，亦可能是 B 细胞的缺陷。患者发病年龄可见于各年龄段，感染程度相对较轻，胃肠道感染多见。易发生自身免疫病或肿瘤，也常伴有中性粒细胞减少、血小板减少、贫血等。实验室检查：IgG<3g/L，IgA、IgM 水平低下；$CD4^+$ 细胞、$CD4^+CD45^+$ 细胞减少，$CD4^+/CD8^+$ 比值下降。

（3）选择性 IgA 缺陷（selective IgA deficiency）：免疫缺陷的原因是浆细胞转化为 IgA 分泌细胞发生障碍，是发病率最高的原发性免疫缺陷病。多数患者可无临床症状或症状较轻。表现为呼吸道、消化道及泌尿道的间歇性感染。由于消化道缺乏分泌型 IgA，某些食物中的变应原易被吸收进入血液循环而发生食物过敏反应。实验室检查：血清 IgA<0.05g/L，IgG、IgM 水平正常。

3. 已确认的免疫缺陷综合征

（1）Wiscott-Aldrich 综合征（威奥综合征）：性连锁隐性遗传病，缺陷基因 WASp 位于 X 染色体短臂（Xp11. 22），编码含 502 个氨基酸的 Wiscott-Aldrich 综合征蛋白（Wiscott-Aldrich syndrome protein，WASp）。该基因突变引起细胞骨架缺陷，影响造血干细胞分化，先天性胸腺发育不良致使 T、B 淋巴细胞的分化均受到影响。以前将该病列入联合免疫缺陷病。临床表现：婴幼儿起病，湿疹、血小板减少，感染常由难治性有荚膜细菌引起，反复发作。实验室检查：IgM、IgG 水平随年龄增长而进行性下降，细胞免疫功能下降。

（2）共济失调毛细血管扩张症（ataxia-telangiectasia）：常染色体隐性遗传病。病因是 ATM 基因（ataxia-telangiectasia mutated gene）突变，引起细胞

增殖周期障碍，导致载有 T 细胞受体和免疫球蛋白基因的染色体不稳定，DNA 修复功能受损。以前该病列为联合免疫缺陷病。临床表现：进行性小脑共济失调，皮肤及眼结膜毛细血管扩张，鼻窦、呼吸道及肺部慢性感染。实验室检查：各类免疫球蛋白水平均下降，细胞免疫功能下降。转氨酶、血糖、甲胎蛋白可能增高。

（3）DiGeorge 异常（DiGeorge anomaly）：出生后发生，或常染色体显性遗传。病因是 22 号染色体部分丢失（22q11-pter）或部分单体性（22q10p），一系列相邻基因异常，使多种器官受累。临床表现：胸腺发育不良，故又称胸腺发育不良综合征。心脏畸形，腭裂，异常小颌面容，甲状旁腺发育不良及低钙血症。实验室检查：外周血中 T 细胞数量减少，B 细胞数量正常，免疫球蛋白水平正常或略低。

4. 免疫失调病　一类由于免疫调节功能异常所致的免疫缺陷病，包括抗原表达、细胞粘附和信号传导缺陷等，多为常染色体隐性遗传。其中 Chediak-Higashi 综合征又称为色素缺乏易感性增高综合征，现已明确该病病因是位于染色体 1q42 的 LYST 基因（lysosomal trafficking regulator gene，LYST：溶酶体转运调节因子基因）缺陷所致溶酶体运输受损。临床表现：部分白化病，易于频繁发生严重的化脓性感染，有出血倾向和进行性神经系统病变。实验室检查：外周血 T、B 淋巴细胞和各类免疫球蛋白水平均正常。NK 细胞和 CTL 细胞活性降低；显微镜下观察粒细胞内有巨大的溶酶体，为该病的特征。

5. 吞噬细胞缺陷　吞噬细胞缺陷包括吞噬细胞数量减少和功能先天性缺陷。

（1）慢性肉芽肿病（chronic granulomatous disease，CGD）：中性粒细胞胞浆颗粒中的髓过氧化物酶参与细胞内吞噬杀菌功能，当氧化还原途径缺陷时，吞噬细胞内不能形成超氧阴离子和过氧化氢酶，因而不能杀灭摄入的过氧化氢酶阳性的细菌如葡萄球菌、某些真菌。病因是 X 染色体短臂的 Xp21.1 位点或染色体 16q24、7q11.23、1q25 缺陷，电子转运蛋白（electron transport protein）基因 CYBB、CYBA 或衔接蛋白（adapter protein）基因 NCF1、活化蛋白（activating protein）基因 NCF2 突变。影响这些蛋白的功能，使中性粒细胞胞浆颗粒中的髓过氧化物酶失去酶活性，中性粒细胞杀菌功能缺失。该病分为性染色体遗传和常染色体隐性遗传两类，常染色体遗传的又分为 3 种。主要表现为长期反复的慢性感染及局部肉芽肿。实验室检查：（1）外周血中性粒细胞 H_2O_2 产生：用化学发光法检测 H_2O_2 产生。髓过氧化物酶杀菌的机制依赖于 H_2O_2 产生，如明显下降提示中性粒细胞杀菌功能缺陷。（2）髓过氧化物酶还原能力：硝基四氮唑蓝（NBT）实验用于检测髓过氧化物酶还原 H_2O_2 的

能力，NBT 还原能力降低提示中性粒细胞杀菌功能缺陷。参考值：NBT 阳性中性粒细胞（含有蓝色颗粒的细胞）百分率：40%～50%，低于此值为异常。

（2）白细胞粘附缺陷（leukocyte adhesion defects，LAD）：病因是整合素或选择素缺陷。整合素和选择素都属于粘附分子。位于第 21 号染色体上的 CD18 β 链的编码基因突变，含有 CD18 β 链的整合素分子 LFA-1（CD11a/CD18）及补体受体 iC3b（CD11b/CD18）和 C3dg（CD11c/CD18）表达异常，表现为吞噬细胞的粘附功能障碍。分为 3 型。临床表现：中性粒细胞粘附功能障碍，易发生皮肤及肠道感染、牙周炎等。实验室检查：白细胞粘附功能实验：用 Borden 小室法或琼脂糖凝胶平板法检测，参考值为 55%～75%。白细胞趋化运动功能（见本书第三章）。

6. 天然免疫缺陷　一类由于免疫系统先天发育异常而表现有免疫缺陷的疾病。典型疾病如伴免疫缺陷的外胚层止汗机制发育不良（anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency，EDA-ID）。发病机制是 NFκB 信号途径障碍。性连锁隐性遗传者为 NEMO 基因缺陷，常染色体显性遗传者为 IKBA 基因缺陷。临床表现：止汗机制不良，特异性抗体缺陷（缺乏对多糖类抗原的抗体应答），多重感染（分枝杆菌、化脓性球菌）。实验室检查主要依赖于特殊基因的检测，外周血淋巴细胞、单核细胞功能不全。

7. 自身炎症性疾病　一类既非感染性又非自身免疫性的炎症性疾病，多系统出现炎症，如关节腔、浆膜腔、中枢神经系统都可能受累。发病因素与细胞内炎症调节因子 pyrin 及 cryopyrin 基因突变或细胞因子受体（如 TNF 受体）相关基因缺陷有关，导致、NFκB 信号传导障碍、白细胞凋亡减少等。典型疾病如家族性地中海发热（familial mediterranean fever），病因是 MEFV 基因缺陷。临床表现为反复发热，浆膜腔炎症，血管炎，炎性肠病。实验室诊断主要依赖于特殊基因的检测。

8. 补体缺陷　补体系统包括补体组分及其抑制因子，除 C1s 外各组分都可由于相应基因缺陷而致外周血中含量减少。相对常见的是 C1q、C2、C1 抑制因子缺陷。多数补体组分缺陷均为常染色体隐性遗传，C1 抑制因子缺陷为常染色体显性遗传，P 因子缺陷为性连锁隐性遗传。补体缺陷的临床表现与抗体缺陷相似，多为反复发生的化脓性感染。补体末端部分缺陷者易感染脑膜炎球菌和淋病奈瑟菌。实验室检查：CH50（总补体溶血活性）、AP50（补体旁路途径溶血活性）如在参考范围以内者，可排除补体组分缺陷的可能。

在补体缺陷中最为重要的疾病是遗传性血管性水肿，又称血管神经性水肿（HAE，hereditary angioedema）。该病是由于第 11 号染色体上 C1 抑制因子编码基因先天性缺陷（Ⅰ型）或点突变（Ⅱ型）所致，为常染色体显性遗传病。

患者由于缺乏 C1 抑制因子（C1-INH，C1inhibitor），补体传统途径过度活化，裂解产物 C3a、C5a 产生过多，表现为反复发作的全身各部位的局限性水肿，胃肠道水肿可致强烈腹痛和腹泻，上呼吸道水肿可因呼吸道痉挛梗阻而窒息死亡。实验室诊断：Ⅰ型 HAE 患者 C1-INH 水平低于健康正常人 50%，C3、C4、CH50 正常，Ⅱ型 HAE 患者血清中存在无功能的 C1 抑制因子，故 C1 抑制因子可检出，但 C4 水平由于过度活化而降低。血清 C-INH 和 C4 均可用散射比浊法进行检测。对疑为 HAE 的患者应同时测定 C1-INH 和 C4 水平才能正确诊断和分型。

继发性免疫缺陷病

常见的继发性免疫缺陷多由于药物、营养不良及 HIV 感染引起。引起免疫低下的药物主要是糖皮质激素和治疗肿瘤、结缔组织病、移植排斥反应的免疫抑制剂如环磷酰胺、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、环孢素及植物提取药物如雷公藤多苷等。这些药物长期或大剂量应用可使淋巴细胞成熟和淋巴细胞合成细胞因子的功能受到抑制，阻断淋巴细胞增殖。实验室检查一般只进行初诊筛查项目即可。主要检查外周血淋巴细胞计数，用流式细胞术检查 T 细胞和 B 细胞数量，用散射比浊法检测各类免疫球蛋白水平。可发现 T 细胞和 B 细胞数量轻度下降，T 细胞减少的程度重于 B 细胞。应用糖皮质激素治疗时，T 细胞中 $CD4^+$ 细胞的减少大于 $CD8^+$ 细胞的减少，应用环磷酰胺时 $CD8^+$ 细胞的减少大于 $CD4^+$ 细胞。各类免疫球蛋白水平可有轻度降低。HIV 感染者表现为 $CD4^+$ T 细胞数量明显减少，$CD4^+/CD8^+$ 小于 1。

［免疫学检验］

1. 初诊筛查项目　初诊筛查项目是指任何临床疑似免疫缺陷病的患者都应进行的共同的实验室检查项目，适用于各种免疫缺陷病，目的是证实免疫缺陷病存在，大致区分是原发性还是继发性免疫缺陷。这些项目在一般医院的临床检验实验室都作为常规项目开展，包括以下 4 个方面：

（1）白细胞总数及分类计数。

（2）T 淋巴细胞及其亚群分类计数（详见本书第五章）。

（3）免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 测定（详见本书第二章）。

（4）补体组分水平和功能测定：C3、C4、CH50（详见本书第三章）。

以上 4 个方面任何一项明显低于参考值者都应考虑免疫低下或免疫缺陷，须进行进一步继续检查。但应注意，原发性免疫缺陷病多见于儿童，但正常儿童免疫球蛋白水平低于成人水平。不要以成人免疫球蛋白水平标准来评估儿童的免疫球蛋白水平。0～15 岁儿童血清免疫球蛋白平均水平占成人免疫球蛋白水平的百分比见表 7-3。

表 7-3　各年龄组儿童血清中 3 类免疫球蛋白的相对水平

年龄组	IgG	IgM	IgA
新生儿（脐带血）	82	10	1.2
2～7 天	81	11	0.9
～1 月	79	46	2.4
～2 月	52	35	5.2
～4 月	38	54	6.9
～6 月	38	60	8.8
～12 月	56	82	16
～2 岁	61	86	25
～4 岁	60	91	29
～5 岁	69	82	40
～8 岁	87	106	79
～11 岁	90	96	78
～15 岁	92	113	95
成年人	100	100	100

2. 继续检查项目　不同种类免疫缺陷病的诊断依赖于继续检查项目，检查目的是明确免疫缺陷病的分类，进一步明确原发性免疫缺陷的种类。

3. 特殊检查项目（深入检查项目）　为了明确某种原发性免疫缺陷病的准确诊断，需要深入进行特殊项目的检查。各种原发性免疫缺陷病的特异性诊断有各自特定的特殊检验项目。检查目的是寻找发现免疫缺陷发生的环节位置和免疫缺陷病的具体名称。判断免疫缺陷病基因缺陷必须依赖于特定的基因诊断。

继续检查项目在较大医院的临床检验实验室和免疫学实验室开展。特殊的实验室检查项目是指为明确诊断某种免疫缺陷病所必须进行的特殊检查，一般医院的检验科不作为常规项目开展，需由专科实验室或研究室进行有针对性的检查。

继续检查和特殊检查项目包括以下方面：

（1）淋巴细胞数量及功能检查

1）T 细胞的表面标志测定及计数：CD3、CD4、CD8、CD25、TCR 等。

2）T 细胞功能测定：对有丝分裂原如 PHA 的增殖反应，即淋巴细胞转化实验。

3）B 细胞表面标志及计数：CD19，CD20，CD21，CD22 等。

4）B 细胞功能测定：检测血清中常见的病毒抗体，如风疹病毒抗体是否阳性，阳性者可认为 B 细胞功能无明显异常。注射疫苗检测对抗原的反应，

包括对常见病毒（风疹、麻疹）疫苗或细菌（白喉、破伤风）类毒素的抗体反应，对多糖抗原（肺炎球菌、脑膜炎球菌）疫苗的抗体反应。在接种前和接种后4周分别测定受检者的抗体水平。如果滴度升高低于4倍，则不论免疫球蛋白水平是否降低，都提示有抗体缺陷。如果已测定发现免疫球蛋白水平或T、B淋巴细胞数明显降低，则可初步判断为免疫缺陷患者，对此类患者禁用各种活疫苗如风疹、麻疹减毒活疫苗以免引起严重感染。

NK细胞的表面标志及计数：CD16，CD56等，NK细胞功能活性的检测（详见本书第三章）。

（2）吞噬细胞功能测定：四氮唑蓝还原（NBT）实验，根据中性粒细胞氧化还原功能评估中性粒细胞杀菌功能。用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌实验直接测定中性粒细胞胞内杀菌功能，中性粒细胞趋化实验等，评估中性粒细胞运动功能。吞噬细胞胞浆成分测定：髓过氧化物酶、弹性蛋白酶、中性粒细胞胞浆抗菌肽、防御素等。

（3）低浓度免疫分子蛋白测定：IgE水平测定，IgG亚类、IgD、补体组分及其他特殊蛋白组分的测定。IgG1亚类浓度与IgG相似也与年龄相关。在2岁后IgG1＜2.50g/L、IgG2＜0.50g/L、IgG3＜0.25g/L或IgG4测不出可诊断为IgG亚类缺陷。

（4）各种细胞因子（白细胞介素、干扰素）及受体、黏附分子、趋化因子的测定。

（5）细胞膜表面分化抗原（CD）测定。

（6）标志性酶的检测：ADA（腺苷脱氨酶）、PNP（嘌呤核苷磷酸化酶）、G-6-PDH（葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，用于诊断中性粒细胞G-6-PDH缺乏）、DNA连接酶Ⅳ、胞嘧啶脱氨酶（AID）等。

（7）染色体和特殊基因的检测：现已确定了20余种原发性免疫缺陷病的异常染色体定位，可通过染色体带的图谱分析进行产前诊断，以便中止妊娠。DiGeorge异常患者有22q11或10p11部分单体性，免疫球蛋白重链基因缺失患者可有14q32删除，用荧光原位杂交（FISH）检测可发现染色体异常。判断原发性免疫缺陷病的基因缺陷或突变必须对特定基因进行单链构象多态性聚合酶链反应（PCR-SSCP）或DNA测序鉴定。

第八章　自身免疫性疾病的抗体分析

第一节　自身抗体的基本概念

一、概　　念

机体对外来抗原产生免疫应答导致外来抗原的清除，而由各种原因造成的机体免疫系统针对自身组织器官、细胞成分发生免疫应答时，机体的免疫系统不能或不易清除自身的细胞或细胞间的抗原成分，而是持续不断地对其进行免疫攻击，引起自身免疫病，产生的抗体称为自身抗体。自身免疫病的特点有：体内有自身抗体和自身反应性淋巴细胞；它们对机体造成损伤和功能障碍；病情转归与免疫反应强度密切相关；反复发作，慢性迁延。一般正常人体内也存在生理性自身抗体，大都滴度低，与相应抗原亲和力弱，其作用主要是用来清理体内衰变和死亡的细胞。

二、命　　名

自身抗体按照其针对的靶抗原分为非组织器官特异性自身抗体和组织器官特异性自身抗体。自身抗体的命名尚不统一，常见的命名方法有如下四种：

1. 按首先被检测到的患者名字命名。如抗 Sm、抗 Ro、抗 La、抗 Sa 抗体等。

2. 以相关疾病的名字英文缩写再加上靶抗原的分子量或发现次序来命名。如 Scl-70，SS-A，SS-B。

3. 以靶抗原的生化名称命名，如抗 ds-DNA，抗 RNP，aCL 等。

4. 以抗原在细胞中的位置命名，如抗核抗体、抗核仁抗体、抗核膜抗体、抗胞浆抗体等。

随着分子生物学的发展，每种靶抗原的生化特性功能将逐一得到阐明，而抗体也会趋向于以靶抗原的生化名称来命名。

三、与临床疾病的相关性

（一）特异性

通俗理解是指抗体和某疾病特异相关性，如某患者高特异性抗 Sm 抗体阳性时，则患 SLE 的可能性极大。

（二）敏感性

如按临床诊断标准判定了 100 位 SLE 病人，但只有 10%～30%的 SLE 病人能检出抗 Sm 抗体，说明该抗体的敏感性低。

（三）相关性分析

要综合敏感性和特异性分析，如抗核抗体，低效价阳性在少部分正常人与病人都可出现，说明特异性低。但如效价很高时，就可能只出现于病人。所以高效价抗体就有较高的敏感性和特异性。

（四）临床应用

自身抗体的临床应用主要是用来诊断和鉴别诊断、判断疾病活动性、疗效和预后。与某种自身免疫性疾病关系密切的自身抗体称为该疾病的标志抗体，特异性极高，但敏感性有时不高，即检出率低，具体见表 8-1。要做到正确诊断就需要正确的诊疗思路，对一个疑似病人需要检查哪些抗体？当检查结果出来后如何分析化验结果？这要有综合分析的能力，才能掌握自身免疫病的诊断，而这需要两方面的基础知识：即疾病的抗体谱和抗体的疾病谱。疾病的抗体谱是指自身免疫性疾病一般具有多种抗体，并且呈现特征性的抗体谱；而抗体的疾病谱是指从单个抗体角度出发，如果阳性会有哪些疾病的可能，只有掌握了这正反两方面的知识，才会提高诊断的准确率。

表 8-1　目前比较公认的部分标志抗体

标志抗体	对应的自身免疫病	检出率
ds-DNA 抗体	SLE	60%～90%
Sm 抗体	SLE	20%～40%
SS-B 抗体	干燥综合征	40%～95%
着丝点抗体	局限型硬皮病	80%～95%
Scl-70 抗体	弥散型硬皮病	25%～70%
PM-Scl 抗体	多肌炎、皮肌炎、重叠综合征	50%～70%
Jo-1 抗体	多肌炎、皮肌炎	25%～35%
高滴度 RNP 抗体	混合性结缔组织病	＞95%
肾小球基底膜（GBM）抗体	肺肾综合征	20%～100%
肝肾微粒体抗体（LKM-1）	Ⅱ型自身免疫性肝病	
平滑肌抗体（SMA）	Ⅰ型自身免疫性肝病	90%

续表

标志抗体	对应的自身免疫病	检出率
线粒体抗体型（M2）	原发性胆汁性肝硬化（PBC）	
角蛋白抗体（AKA）	类风湿关节炎	36%～59%
抗桥粒抗体	寻常天疱疮	
肌内膜抗体（EMA）	麸质过敏性肠病	

第二节　非组织器官特异性自身抗体的分析

一、常见非组织器官特异性自身免疫病的抗体谱

（一）系统性红斑狼疮

系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus，SLE）为典型的自身免疫性疾病，其特点为血清中有抗核抗体等多种抗体。其中抗双链 DNA 抗体及 Sm（Smith）抗体为该病特异性抗体。除抗核抗体外，还发现有抗其他细胞成分的自身抗体，如抗红细胞抗体、抗血小板抗体、抗神经元抗体、抗淋巴细胞抗体等，还可见类风湿因子、抗磷脂抗体等，具体见表 8-2。

表 8-2　系统性红斑狼疮常见的自身抗体

抗　原	发生率
双链 DNA	60%～90%
单链 DNA	70%～95%
RNA	50%
组蛋白	30%～70%
U1-nRNP	30%～40%
Sm	20%～40%
SS-A（Ro）	20%～60%
SS-B（La）	10%～20%
增殖细胞核抗原（PCNA）	3%
Ku	10%
核糖体 RNP（rRNP）	10%
热休克蛋白 90（Hsp-90）	50%
心磷脂	40%～60%

该病的临床表现常有面部红斑、光过敏、口腔溃疡、非侵蚀性关节炎、浆膜炎（胸膜炎、心包炎）、肾脏病变、神经系统异常、血液学异常等表现。

（二）类风湿关节炎

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是最常见的自身免疫性疾病，发病率有 0.36%，其免疫学特点是有类风湿因子，且是临床诊断标准之一，随着基础医学的发展，其他特异性较强的自身抗体也逐渐增多，有抗丝集蛋白抗体（也称抗角蛋白抗体）、抗核周因子等，特别是近几年来临床应用较广泛的抗环瓜氨酸抗体显示了较高的诊断价值，具体见表 8-3。

表 8-3 类风湿关节炎常见的自身抗体

抗 原	发生率
IgM 型类风湿因子	80%
单链 DNA	8%
U1-nRNA	3%
组蛋白	15%～50%
抗丝集蛋白抗体	36%～59%
抗Ⅱ型胶原抗体	50%
抗环瓜氨酸抗体	49%～68%
抗 Sa 抗体	23%～40%
抗 RA33 抗体	35%

该病的临床特点为：

1. 关节表现　起病时通常先侵犯手与足的小关节，呈对称性、持续性肿胀和压痛，常伴有晨僵。

2. 关节外表现　血管炎、皮肤和肌肉萎缩、皮下结节、淋巴结肿大、脾大、白细胞计数减少、胸膜炎、心包炎、间质性肺炎等。

（三）干燥综合征

干燥综合征（Sjogren's syndrome，SS）常侵犯外分泌腺如泪腺与唾液腺等，从而产生眼干和口干。干燥综合征可分为原发性及继发性。干燥综合征患者通常有多种自身抗体，近一半的患者伴有高丙种球蛋白血症。如抗体水平突然变化要警惕恶性肿瘤的发生，具体见表 8-4。

表 8-4 干燥综合征常见的自身抗体

抗 原	发生率
SS-A (Ro)	40%～95%
SS-B (La)	40%～95%
单链 DNA	13%
唾液腺流出道	40%～60%
类风湿因子	60%～80%

临床特点：可见角膜、口腔、鼻、气管、阴道和皮肤发生干燥；其他系统也可有异常：中枢神经系统（偏头痛、精神异常、外周神经功能紊乱）、肾脏（肾小管酸中毒、肾结石）、肺部（肺部炎症及纤维化）以及淋巴瘤、关节炎等，常可伴发淋巴瘤。

（四）硬皮病

硬皮病（scleroderma，Scl）是一种原因不明的临床上以局限性或弥漫性皮肤增厚和纤维化为特征的结缔组织病，该病分为局部病变与全身性病变，局部病变仅侵害少量皮肤（局限性硬皮病）；全身性病变则称为进行性系统性硬化症（progressive systemic sclerosis，PSS），可分为五种亚型，具体见表8-5。

表 8-5　硬皮病常见的自身抗体

抗　原	发生率
原纤维蛋白	5%～10%
PM-Scl	50%～70%
Scl-70	25%～70%
RNA 多聚酶 I	4%
抗着丝点抗体（局限型）	80%～95%
ssDNA	30%～60%
Ku	1%～7%
7-2-RNP	罕见
NOR-90（核仁形成中心）	罕见

该病的临床表现：有雷诺现象，皮肤硬化，口周皮肤病损造成张口受限，皮肤蜡样感等；晚期其他系统可见：关节痛、关节周围皮肤变化造成的关节活动受限；食管肌功能丧失，吞咽困难；肠蠕动减少，肠肿胀、扩张，便秘；干性咳嗽、肺间质病变；心律失常，晚期发生心衰；肾血管病变肾衰竭；神经麻痹、麻木；常有肌炎，偶见伴发肺癌。

（五）混合性结缔组织病

混合性结缔组织病（mixed connective tissue disease，MCTD）是指临床上有红斑狼疮、皮肌炎或多发性肌炎、硬皮病、类风湿关节炎等疾病特征的临床综合征，而不能确定为哪一种疾病的疾病。其最显著的免疫学特点为，血清中存在高滴度的抗核糖核蛋白（nRNP）抗体，具体见表8-6。

临床上以女性多见，几乎所有患者都有关节疼痛和发僵，出现皮肤黏膜病变，肌肉疼痛，少数可见有肾脏损害、心包炎、胸膜炎、肺纤维化等临床表现。

表 8-6 混合性结缔组织病常见的自身抗体

抗 原	发生率
抗核抗体（ANA）	>95%
U1-nRNP	>95%
ssDNA	15%～35%

（六）多发性肌炎及皮肌炎

多发性肌炎（polymyositis，PM）是一种以损害肌肉为主要表现的自身免疫性疾病，如果同时有皮肤损害，则称为皮肌炎（dermatomyositis，DM）。多发性肌炎及皮肌炎患者存在多种自身抗体。其中较特异的四种抗体，Jo-1 及 Mi 主要见于多发性肌炎，而 PM-Scl 及 Ku 多见于多发性肌炎与硬皮病的重叠，具体见表 8-7。

表 8-7 多发性肌炎及皮肌炎常见的自身抗体

抗 原	发生率
ssDNA	40%～50%
PM-Scl	50%～70%
Mi-1	10%
Jo-1（组氨酰-tRNA 合成酶）	25%～35%
Mi-2	5%
ssDNA	30%～60%
Ku	5%

该病表现有皮肤损害、近端肌无力、触痛；重症晚期患者可有呼吸困难甚至危及生命。诊断需进行肌活检、肌电图及血肌酶检查，结合临床表现可确诊。偶可伴发肺癌，以及乳腺、卵巢、子宫、结肠等上皮癌。

二、常见风湿免疫性自身抗体的疾病谱

（一）抗核抗体

是指抗细胞核成分抗体的总称，一般大部分风湿免疫性疾病都呈现抗核抗体阳性，因此是临床最常用的初筛项目。

［概述］

常见的抗体有：着丝点抗体、ds-DNA 抗体、组蛋白抗体、SS-B 抗体、SS-A 抗体、Mi-2 抗体、核仁抗体、核小体抗体、增殖细胞核抗原抗体（PC-NA）、Scl-70 抗体、SS-DNA 抗体、U1-RNP 抗体，具体见表 8-8。

表 8-8　靶抗原按照在细胞核中定位可分为如下种类

染色质	ds-DNA、ssDNA、组蛋白、高活性组蛋白
着丝点	着丝点相关白蛋白 A、B、C
核仁	核仁 RNA 或核仁蛋白（原纤维蛋白、RNA 多聚酶、多肌炎-硬皮病重叠抗原）
核浆/核基质	U-SnRNP（Sm、U、RNP 抗原）Y- SnRNP 复合物（SS-A/Ro 和 SS-B/La 抗原）
卷曲小体	p80 卷曲蛋白
PML 小体	Sp100
核膜	板层素、板层蛋白-B 受体、gp210

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光法　常以 Hep-2（喉肿瘤细胞）为基质，效价>1∶80 为阳性。

2. ELISA　应用整个细胞核、核抽提物、混合物或纯化重组核蛋白。

［临床意义］

1. ANA 主要是风湿免疫性疾病的初筛实验。低效价抗体也可在感染、肿瘤及正常老年人中出现，因此>1∶80 才有临床意义，具体见表 8-9。

表 8-9　抗核抗体的疾病谱

自身免疫性疾病	ANA 阳性率
活动性 SLE	95%～100%
非活动性 SLE	80%～100%
药物诱导性狼疮	100%
混合性结缔组织病	100%
RA	20%～40%
进行性系统性硬化症	85%～95%
多肌炎和皮肌炎	30%～50%
干燥综合征	70%～80%
慢性活动性肝炎	30%～40%
溃疡性结肠炎	26%
其他风湿病	20%～50%

2. 荧光法常分为五种核型　均质型、核膜型、斑点型、核仁型、着丝点型，还有其他各种少见核型。荧光法仅是定性和定位诊断，只能初步预测可能是何种抗原，不能就此定为具体何种靶抗原，需进一步实验来确认抗体。

（1）均质型：核质染色均匀，此种染色型别与抗组蛋白抗体有关，许多自身免疫病患者的血清中有此抗核抗体。

（2）核膜型，或称周边型，近核的边缘部分染较强的荧光，中心厚，发暗，与此型相对应的为抗双链 DNA 抗体，多见于 SLE，特别是有狼疮肾炎的

患者。

（3）斑点型：核内散布大小不等染荧光的斑点，与此型相关的抗体为抗可溶性核抗原抗体。

（4）核仁型：仅核仁染荧光，此类染色型别与核内的核糖体有关，这种抗体多见于 SLE 患者。此外，在 SSc 阳性率可达 40%。

（5）着丝点型：此种染色型别必须以组织培养细胞为底物才能检测到。染色特点为分裂象的细胞核，核膜消失，染色体向两端整齐排列，着丝点部位染荧光，荧光斑点不会超过染色体数。

3. 效价高低变化与临床疾病活动性关联不大。

（二）抗 ds-DNA 抗体

［概述］

是 SLE 的标志性抗体，首先发现于 1957 年，美国 ACR 于 1982 年将其列入诊断标准之一，靶抗原是天然的双链 DNA，反应位点位于 DNA 脱氧核糖磷酸框架上，抗体含抗 ssDNA 和 dsDNA，而抗 ssDNA 一般是低亲和力抗体，是 ssDNA 形成分子内双螺旋而形成的表位，多数情况下，dsDNA 的表位是由葡萄糖-磷酸主链构成。

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光法（ANA） 基质一般为马疫锥虫或绿蝇短膜虫，在动基体初可见强荧光。

2. 放射免疫法（Farr） 比值>20%为阳性，结果高特异性，低敏感性。

3. 酶免法 敏感性高，特异性低。

［临床意义］

1. 活动性 SLE 伴有肾损害的患者检出率>95%，无肾损害的活动性 SLE 检出率为 50%～70%，非活动性 SLE<40%，滴度高低和疾病活动性密切相关。

2. 也可作预后的指标，持续高滴度预示着发生肾损害和中枢神经损害的可能性增加。

（三）抗组蛋白抗体

［概述］

是抗细胞核中组蛋白的总称，于 20 世纪 70 年代初期发现，随着对核小体结构的阐明，该抗体也得以深入研究。

靶抗原为核小体中的组蛋白，有五种蛋白 H1（26 500），H2A（14 000），H2B（13800），H3（15 300）H4（10 200），DNA 包绕 H2A，H2B，H3，H4，再由 H1 连接形成核小体，是遗传物质贮存的结构方式。

[免疫学检验]

1. 间接免疫荧光法　以 HEP-2 细胞为底物，阳性结果呈现均质型荧光。

2. 放免法（RIA）　采用分离的组蛋白或合成的组蛋白的混合物为底物。

3. 免疫印迹法。

[临床意义]

主要在药物性狼疮中出现，在其他疾病中也可检出，具体见表 8-10。

表 8-10　抗组蛋白抗体的疾病谱

疾病名称	检出率
SLE	50%～80%
药物诱导的狼疮	92%～95%
RA	可达 11%
RA 血管炎	可达 75%
Felty 综合征	可达 9%
幼年 RA	51%
系统性硬化	可达 30%
ANA 阳性未分化为结缔组织病	可达 90%
原发性胆汁性肝硬化	可达 55%
自身免疫性肝炎	可达 35%

（四）ENA 抗体

是细胞核中可用盐水提取的一组靶抗原的总称，主要靶抗原成分有 RNP、Sm、SSA、Scl-70、rRNP 等，而 Jo-1 其实是细胞浆中的氨基酸-tRNA 酶，但一直被归为 ENA 中，一同被制成整体条带试剂，用于风湿免疫病诊断与鉴别诊断。ENA 抗体检查在风湿免疫病中具有重要作用，尤其当荧光 ANA 呈阳性时就需要 ENA 实验确认，绝大部分常见的风湿性疾病患者血清中都能找到抗 ENA 中某一抗体，因此是临床最常用的诊断检查之一。

目前常用的方法有：①免疫双扩散法：常用来检测 u1RNP，Sm，SSA，SSB 抗体，因其所用抗原为牛胸腺粗提物，保留有具有空间构象的表位，因此其优点可能是能检测出抗空间决定簇抗体，因此其临床符合率高，国内几家著名的风湿病学科以及国外常用此法，与免疫印迹法结合能提高诊断准确性，其缺点是所需试剂至今没有正规批号的产品投放市场，操作时间较长，结果分析需要一定的经验，从而限制了广泛应用；②免疫印迹法（IBT）：由于抗原是采用分子生物学方法制备，一般只具有线性决定簇，加之要经过电泳分离转移到硝酸纤维素膜上等多个制备程序而影响了抗体的检测准确性，常导致假阴性

结果，因此临床医务人员应知道该方法的局限性；③ELISA 法。

1. SnRNP

[概述]

SnRNP 是小核糖核蛋白颗粒（small nuclear ribonucleoprotein particle）的英文缩写，1966 年被发现。靶抗原由小核糖核酸和蛋白组成，其中小核糖核酸由于其组成富含尿嘧啶又被称为 U-nRNP，目前常见有 12 种，被简称为 U1，U2，…，U11 等，主要靶抗原为 U1-nRNP。

SnRNP 的核心蛋白部分称为 Sm 抗原，含有 B，B′（28 000/29 000），D1，D2，D3，（16 000）E（12 000），F，G，主要靶抗原为 SmD1。因此 SnRNP 抗体含有抗 U-nRNP 和 Sm 抗体的混合成分。

[临床意义]

U1-nRNP 在混合性结缔组织病（MCTD）患者中阳性率为 95%～100%，在 SLE 中为 30%～70%。RA 中 15%～50%。Sm 抗体一般只出现在 SLE 中，特异性极高，但阳性率只有 20%～40%。

2. SS-A/RO 抗体

[概述]

首次发现于 1962 年，1969 年两个实验室同时在患者中检测到此抗体，分别命名为 SS-A 和 Ro 抗体，实为一种靶抗原，指定位于细胞核中的核糖核蛋白中的 60 000 和 52 000 的两种蛋白，一般与 hY-RNA 组成复合物，在 mRNA 翻译活动中起作用。

[临床意义]

(1) 在结缔组织病中常被检出，在干燥综合征中 40%～95%，SLE 20%～60%，新生儿狼疮 100%，RA 5%～8%，SSc 9%，PBC 20%。

(2) 目前某些免疫印迹法试剂条带中分别转有 60 000 和 52 000 的靶抗原，如单独出现 52 000 阳性条带不作为 SSA 阳性结果，国内也有学者认为 52 000 条带无病理意义。但基础研究已证实 Ro-52 000 在 IL-2 的产生中起重要作用，国外也有学者认为 52 000 阳性比 60 000 抗体对原发性干燥综合征更特异，因此其临床意义有待进一步研究。

3. SSB/La 抗体

[概述]

1961 年干燥综合征患者中首次被发现，靶抗原为细胞核中的相对分子质量为 48 000 的磷酸蛋白，生化作用是作为 RNA 多聚酶Ⅲ的辅助蛋白，该酶合成低相对分子质量 RNA，在转录过程中，SS-B 随着新合成的 RNA 分子一并释放出来。

[临床意义]

是SS的标志性抗体，在SS中阳性率为40%～95%，SLE中10%～20%，在SS中SS-A和SSB一般同时出现。

4. Scl-70抗体

[概述]

1979年采用免疫双扩散法首次在硬皮病患者血清中发现的抗拓扑异构酶-1，其相对分子质量为70 000而命名，而DNA拓扑异构酶完整的相对分子质量为100 000位于核浆，70 000是其降解产物，其功能为在DNA链的复制和转录中起作用，切断DNA双链并附着在产生的自由端上。

[临床意义]

弥漫性系统性硬化患者阳性率为25%～70%，局限性硬皮病为阴性。

5. Jo-1抗体

[概述]

Jo-1抗体是1980年在原发性多肌炎患者中发现的一种自身抗体，1983年证实靶抗原为组氨酰-tRNA合成酶，随后以检出苏氨酰-tRNA合成酶抗体（PL-7），丙氨酰-tRNA合成酶抗体（PL-12抗体），异亮氨酰-tRNA合成酶抗体（OJ抗体）和甘氨酸-tRNA合成酶抗体（EJ抗体），其功能是合成蛋白质。

[临床意义]

是多发性肌炎的标志性抗体，敏感性18%～46%，而幼年肌炎几乎检测不出，阳性患者预后不良。抗体滴度随病情活动而变化。

（五）着丝点抗体

[概述]

1980由Moroi首次发现。在细胞即将分裂前，每一条染色体由基因完全相同的两条染色单体组成，染色单体在着丝点区结合在一起，每一着丝点含有一个着丝粒，在细胞进一步分裂过程中，纺锤体纤维附着在着丝粒上，将染色单体向它们相应的中心粒方向牵拉。

靶抗原为着丝粒中三种蛋白质：A（17 000），B（80 000），C（140 000），主要抗原为着丝蛋白B。

[免疫学检验]

间接免疫荧光，是一可以从荧光图形上初步确定抗体之一，常用免疫印迹法确认。

[临床意义]

是局限性硬皮病（CREST综合征）的标志抗体，特异性高且阳性率高80%～95%，对于鉴别局限型和弥漫型硬皮病起重要作用。局限型患者内脏受

累少，弥漫型患者始为四肢，后内脏受累严重，病情进展迅速，预后不良。

（六）核糖体抗体

［概述］

SLE 除了有大量抗细胞核成分抗体外，还有抗细胞质成分抗体，核糖体就是近十年来初步阐明的靶抗原。核糖体是细胞质中由核糖核酸和蛋白质组成，功能是将 mRNA 翻译为成熟蛋白质，其组成成分中 80S 由 60S 大亚基单位和 40S 小亚单位组成，60S 大亚基由多种碱基和 3 种磷酸蛋白组成，分别命名为 P0、P1、P2 三种磷酸蛋白，是核糖体主要的靶抗原成分。

［免疫学检验］

常用方法有间接免疫荧光，ELISA 和蛋白印迹法、放免法，其中 ELISA 和放免法较灵敏特异。

［临床意义］

SLE 患者 P 蛋白抗体阳性率一般为 10%～20%，P 抗体常与精神狼疮高度相关。

（七）抗线粒体抗体

［概述］

是 1965 年首次在原发性肝硬化患者中发现，靶抗原位于真核细胞线粒体内膜的 2-鹅酸脱氢酶复合体上，参与糖脂肪氨基酸的代谢，为一组自身抗原，命名为 M1、M2 到 M9。

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光法　用大鼠肾作基质可见锯齿样荧光，用 HEP-2 细胞可见胞浆中核荧光。

2. 欧蒙斑点法或免疫印迹法　阳性结果在相应条带位置显色。

［临床意义］

对原发性胆汁肝硬化（PBC）最具意义的为 2 型，发生率可达 98%，特异性达 97%。

1. AMA-1　梅毒，干燥综合征。
2. AMA-2　PBC。
3. AMA-3　药物诱导的狼疮。
4. AMA-4　PBC 与自免肝的重叠。
5. AMA-5　SLE，自身免疫性溶血性贫血。
6. AMA-6　由异烟肼引起的药物性肝炎。
7. AMA-7　自身免疫性肝炎。
8. AMA-8　自身免疫性肝炎，闭塞性血栓血管炎。

9. AMA-9　药物性肝炎。

10. AMA-10　SLE。

（八）其他抗核抗体

随着研究的深入，目前已发现的数十种抗核抗体与风湿免疫病相关，但由于出现的阳性率不高，一般小于 10%，少用于日常临床工作，但很有研究价值，具体见表 8-11。

表 8-11　少见抗核抗体的靶抗原、相关疾病、发生率

靶抗原	生化特性	相关疾病	发生率
Ku	DNA-依赖性蛋白激酶的催化亚基中结合 DNA 成分	SLE、MCTD	10%
Mi-1	75 000 蛋白，功能未知	DM/PM	30%
Mi-2	Bo-220 000 的五种蛋白质功能未知	DM/PM	10%
原纤维蛋白	34 000 蛋白，是核糖核蛋白颗粒 U3-nRNP 的组成成分	SSc	5%～10%
RNA 多聚酶 I	核仁酶复合体，相对分子质量为 12 500 到 210 000 之间，负责 45s-rRNA 编码基因的转录	SSc	4%
PM-Scl	核仁中一含 16 个多肽相对分子质量介于 20 000到 110 000 复合体，功能未知，主要靶抗原为 80 000～100 000	重叠综合征	50%～70%
增殖细胞核抗原 PCNA	是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白，控制细胞周期	SLE	3%

在核中：还发现多核点型（SP100）和少核点型抗体（少点型 P80 卷曲蛋白抗体），抗板层素抗体，抗核糖核酸抗体，抗 7-2-核糖体蛋白；抗有丝分裂相关自身抗体有抗中心粒抗体、抗纺锤体纤维抗体、抗分离带抗体、抗染色体相关抗原抗体；细胞浆中有抗高尔基抗体、抗溶酶体抗体、抗肌动蛋白抗体、抗波形蛋白抗体、抗信号肽识别颗粒抗体。它们的临床意义有待进一步研究。

（九）类风湿关节炎相关抗体

1. 类风湿因子

［概述］

是最早发现的自身抗体，1940 年就开始应用于 RA 的诊断。靶抗原是免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段（CH2 和 CH3）结构域，对聚集变性的 IgG 亲和力更强，产生的抗体以 IgM 占优势，IgA、IgG、IgE、IgD 型 RF 也可见于其他

疾病。

[免疫学检验]

(1) 血凝集实验。

(2) 乳胶凝集实验。

(3) ELISA 定量法。

(4) 乳胶颗粒比浊法。

[临床意义]

RF 阳性是美国风湿病学规定的诊断 RA 的标准之一，在幼年类风湿中检出率只有 5%，成人 RA 患者检出率达 50%～90%，在冷球蛋白血症患者中达 40%～100%。其他系统性风湿疾病一般为 10%～60%不等。而在非风湿性疾病中也有较高的检出率，感染性疾病为 10%～60%。肿瘤达 5%～25%，正常健康人为 1%～4%，大于 60 岁达 5%～12%。

2. 抗核周因子

[概述]

1964 年荷兰学者用颊膜细胞为底物检查抗核抗体时，意外发现核周围有均质型荧光颗粒，称为核周因子，进一步研究发现主要出现在 RA 血清中，而在 SLE 等其他风湿病中几乎不出现，靶抗原为 200 000～400 000 的前丝集蛋白。

[免疫学检验]

间接免疫荧光法：观察 100 个细胞，阳性数>5 个，2～5 个可疑，<2 个为阴性。

[临床意义]

对 RA 的敏感性是 49%～87%，特异性达 79%～90%，青少年敏感性只有 30%，阳性 RA 比阴性 RA 病情更重、关节功能损害重，并发关节外症状多。

3. 抗角蛋白抗体

[概述]

1979 年 Young 等人发现 RA 患者血清中有能与大鼠食管蛋白角质层成分起反应的抗体，且发现该抗体对 RA 诊断有较高的特异性，随后 1995 年研究证实角蛋白成分是丝集蛋白，为酸性磷酸蛋白，由多个亚单位组成。

[免疫学检验]

间接免疫荧光法：基质为大鼠食管角质层，阳性结果为一环状强荧光带。

[临床意义]

是 RA 的诊断新指标，特异性达 90%，敏感性 40%～55%，效价与疾病

活动性相关，且在症状出现之前出现抗体，因此是一个早期诊断的指标。

4. 抗 Sa 抗体

[概述]

是 1990 年左右在一位名字叫 Savoic 的 RA 患者中发现的新抗体，靶抗原为一酸性蛋白，等电点 5，相对分子质量为 53 000，多肽序列与 Vimentin 的氨基酸同源，50 000 的多肽与人二硫化蛋白异构酶 N 端氨基酸完全同源，而与已发现的 RA 抗体无交叉反应。

[免疫学检验]

免疫印迹法：出现 55 000 或 50 000 条带为阳性。

[临床意义]

在 RA 中阳性率达 40%以上，特异性高达 98.9%，与疾病的关节症状相关。

5. 抗环瓜氨酸

[概述]

是 1998 年最新建立的诊断 RA 的新方法，靶抗原为人工合成的前丝集蛋白氨基酸短肽，经胍氨酸修饰，再经高效液相色谱纯化而成，纯度大于 98%，已有商品试剂盒供应。

[免疫学检验]

目前仅有 ELISA 方法。

[临床意义]

对 RA 具有较高的诊断价值，敏感性 68%～75%。即使早期患者也达 40%～60%，现有资料显示，CCP 和 APF、AKA 等抗体不是相互涵盖的诊断项目。

第三节 组织器官特异性自身抗体的分析

一、常见组织器官特异性自身免疫病的抗体谱

（一）消化系统自身免疫性疾病的抗体谱

1. 溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC） 抗小肠杯状细胞抗体、抗中性粒细胞胞浆抗体、抗结肠抗体。

2. 克罗恩病（Crohn′s disease，CD） 抗胰腺腺泡抗体、抗中性粒细胞胞浆抗体。

3. 萎缩性胃炎及恶性贫血（pernicious anemia，PA） 抗胃壁细胞胞浆脂

蛋白成分的抗体、抗内因子抗体。

4. 麸质过敏性肠病（gluten-sensitive enteropathy，celiac disease） 抗肌内膜抗体。

5. 自身免疫性肝炎（autoimmune hepatitis）

（1）Ⅰ型：抗核抗体（ANA）、抗平滑肌抗体（ASMA）。

（2）Ⅱ型：抗肝肾微粒抗体（LKM-1）、抗肝细胞浆抗原抗体（LC-1）。

（3）Ⅲ型：抗可溶性肝抗原（SLA）。

6. 原发性胆汁性肝硬化（primary biliary cirrhosis，PBC） 抗线粒体抗体（M2）、抗核包膜抗体、抗核点抗体、抗着丝点抗体。

7. 原发性硬化性胆管炎（PSC） 抗中性粒细胞胞浆抗体（pANCA）。

（二）内分泌系统自身免疫性疾病的抗体谱

1. 1型糖尿病 抗胰岛细胞抗体。

2. Grave病 抗TSH受体抗体、抗甲状腺球蛋白抗体、抗甲状腺微粒体抗体。

3. 桥本甲状腺炎 抗甲状腺球蛋白抗体、抗甲状腺微粒体抗体。

4. 自身免疫性Addison病 抗肾上腺皮质抗体。

5. 特发性甲状旁腺功能低下 抗甲状旁腺组织抗体。

（三）泌尿系统自身免疫性疾病的抗体谱

1. 肺出血肾炎（Goodpasture)综合征 抗肾小球基底膜抗体（抗GBM抗体）。

2. 免疫性肾小管疾病 抗肾小管基底膜抗体（抗TBM抗体）。

3. 继发性肾小管酸中毒 抗肾集合管抗体。

4. 原发性系统性小血管炎 抗中性粒细胞胞浆抗体谱。

（四）血液系统自身免疫性疾病的抗体谱

1. 自身免疫性溶血性贫血 抗红细胞抗体。

2. 特发性血小板减少性紫癜（ITP） 抗血小板抗体。

3. 恶性贫血 抗胃壁细胞抗体、抗内因子抗体。

（五）循环系统自身免疫性疾病的抗体谱

1. 大动脉炎 抗主动脉抗体。

2. 风湿热、心肌炎、扩张型心肌病 抗心肌抗体。

（六）神经系统自身免疫性疾病的抗体谱

1. 重症肌无力自身抗体谱 抗骨骼肌抗体（ASA）、抗乙酰胆碱受体（AchR）抗体。

2. 多发性硬化（MS）自身抗体谱 抗髓鞘碱性蛋白（MBP）抗体、抗脑

苷脂抗体、抗神经节苷脂抗体。

3. 急性炎症性脱髓鞘性多发性神经炎（吉兰-巴雷综合征）自身抗体谱 抗髓鞘糖脂抗体、抗髓鞘硫脂抗体。

（七）生殖系统自身免疫性疾病的抗体谱

1. 免疫性不育（孕）的自身抗体 抗精子抗体、抗卵巢抗体、抗透明带抗体。

2. 免疫性流产自身抗体谱 抗磷脂抗体（抗心磷脂抗体、抗 β2-GP1）抗体。

（八）皮肤组织自身免疫性疾病的抗体谱

1. 天疱疮自身抗体

（1）抗天疱疮抗体（抗棘细胞间抗体）。

（2）抗桥粒抗体（抗 Dsg-1 抗体、Dsg-2 抗体、抗 Dsg-3 抗体）。

2. 大疱性类天疱疮自身抗体 抗类天疱疮抗体（抗表皮基底膜抗体）。

3. 疱疹样皮炎自身抗体 抗肌内膜抗体、抗麦胶蛋白抗体、抗网硬蛋白抗体。

二、常见组织器官特异性自身抗体的疾病谱

已有的理论分析认为：人体每个组织器官系统都可存在自身免疫性抗体，然而由于抗体的阳性检出率及检测技术等原因，临床常规开展的抗体检测项目并不多，简述如下。

（一）血液系统常见的自身抗体

1. 抗中性粒细胞胞浆抗体（ANCA）

［概述］

该抗体是 20 世纪 80 年代发现并应用于临床，由于首先采用间接免疫荧光法发现有三种不同的荧光图形，将该类抗体分为三型，胞浆型（cANCA）、核周型（pANCA）、不典型 ANCA。cANCA 的靶抗原一般为蛋白酶 3（PR3），pANCA 的靶抗原一般为髓过氧化物酶（MPO），随着研究的深入，陆续阐明了其他对应的靶抗原。

（1）微生物蛋白-细菌通透性蛋白。

（2）两种中性丝氨酸蛋白酶——弹性蛋白酶和组织蛋白酶。

（3）β-葡萄糖苷酸酶以及乳铁蛋白，溶菌酶，溶酶体膜蛋白 2，2-烯醇酶等以及一些尚未明确的靶抗原。

［免疫学检验］

（1）间接免疫荧光法：主要用来初筛，按照阳性荧光图形尚需进一步

确认。

（2）免疫印迹法：作为确认靶抗原的检查方法，阳性条带显色。

（3）ELISA：也作为确认靶抗原的方法之一，往往 6 种以上蛋白质靶抗原同时包被来检测抗体。

［临床意义］

具体见表 8-12。

表 8-12 ANCA 阳性的疾病谱

相关疾病	荧光模型	靶抗原
Wegener 肉芽肿	cANCA，偶见 pANCA	PR3，偶见 MPO
微动脉炎	cANCA，pANCA	PR3
Chang-Stranuss 综合征	pANCA	MPO
结节性多动脉炎	偶见 ANCA	偶见 PR3 或 MPO
SLE、RA	pANCA	偶见 MPO，乳铁蛋白
溃疡性结肠炎、原发性硬化性胆管炎、克罗恩病	pANCA，不典型 ANCA	组织蛋白酶 G，乳铁蛋白，弹性蛋白酶，溶酶体和其他未知抗原
自身免疫性肝炎	pANCA，不典型 ANCA	MPO

2. 抗红细胞抗体

［概述］

1904 年首先由 Landsteiner 报道，是人体内第一个被阐明的抗体，分为温抗体、冷凝集素抗体和 DL 抗体三大类，引起自身免疫性溶血性贫血，靶抗原就是红细胞本身的膜结构，温抗体的靶抗原几乎包括所有血型系统，其中以 Rh 系统为主；冷凝集素抗体是 Vo、F1、Gd 抗原；DL 抗体靶抗原是血型 P 系统的 P 抗原，生化特性一般为糖蛋白、血型糖蛋白及磷脂。

［免疫学检验］

间接 Coombs 实验、蛋白酶处理的红细胞凝集实验：温抗体最佳反应温度为 37℃，冷凝集素抗体为 0℃。

［临床意义］

阳性表示体内有抗红细胞抗体，同自身免疫性溶血性贫血密切联系，可为自发性、原发性或继发于其他疾病。

3. 抗血小板抗体

［概述］

血小板减少性紫癜（1TP）是由 Werlhof 于 1735 年首次报道，然而直到 1951 年才发现血小板自身抗体的致病性，1994 年研究认为是引起 1TP 的主要

原因。靶抗原分为两类：一类是抗 HLA-Ⅰ类抗原，二类是抗 GP 抗原抗体。分别为血小板特异抗原 HLA-Ⅰ类抗体和血小板表面糖蛋白 GPⅢb/Ⅲa、GP1b/1x、GPV。

［免疫学检验］

（1）血小板单克隆抗体固相法，临床常用此法。

（2）其他还有 ELISA、免疫荧光、免疫凝集、抗原捕获法等。

［临床意义］

辅助诊断血小板减少性紫癜、新生儿同种免疫型 1TP、HIV、SLE 相关的 ITP。

4. 抗胃壁细胞抗体，抗内因子抗体

［概述］

恶性贫血主要是缺乏维生素 B_{12}，免疫性抗体阻止了维生素 B_{12}吸收。1962 年采用补体固定技术首次从恶性贫血患者血清中检测到靶抗原为胃 H/K ATP 酶的抗体，该酶功能是维持胃腔内酸性环境；抗内因子抗体是 1958 年由 Schwarz 在恶性贫血患者血清中发现，内因子是胃壁细胞分泌的一种糖蛋白，相对分子质量 60 000，不耐热，易被蛋白酶灭活，但与维生素 B_{12}结合后不被酶灭活，其功能是与维生素 B_{12}结合，转至肠腔中，与小肠黏膜上皮细胞表面的受体结合而被吸收。

［免疫学检验］

抗胃壁细胞抗体多用间接免疫荧光法，基质为小鼠胃，也可用 ELISA；抗内因子抗体一般用 ELISA 法，或采用放射免疫分析法。

［临床意义］

90%的恶性贫血患者有抗胃壁细胞抗体，可用来鉴别诊断巨幼细胞贫血，该抗体也可见于 20%～35%的胃黏膜萎缩的患者，以及缺铁性贫血、十二指肠溃疡、甲状腺疾病和青少年糖尿病，正常老年人有 2%～4%阳性。

抗内因子抗体在恶性贫血中检出率为 65%～75%。其他疾病检出率 <3%，两种抗体联合检测有助于提高敏感性。

5. 抗磷脂抗体

［概述］

是抗血液中凝血成分的总称，包括几十种成分。1906 年开始研究，血清学实验原用于梅毒检查，因梅毒螺旋体抗原与凝血成分有交叉，导致有抗磷脂抗体的患者也出现假阳性，随后的研究表明，靶抗原已不局限于磷脂，包括糖脂磷、脂蛋白、糖蛋白以及它们的复合物，主要引起凝血功能障碍。目前临床上常用的有代表性的抗体为心磷脂抗体和 β-GP1 抗体，心磷脂抗体的靶抗原

为二磷酸甘油结构，无生物种属特异性，β-GP1 是血循环中一种阴离子磷脂蛋白，相对分子质量 50 000，只有与脂膜上带负电荷磷脂结合才形成结构表位，产生针对不同表位的抗体。

[免疫学检验]

ELISA 法，分别用心磷脂和 β-GP1 糖蛋白作为靶抗原包被，但该检测技术由于磷脂包被不稳定而引起定量检测的稳定性有待提高。

[临床意义]

阳性患者说明体内存在抗凝物，效价与持续时间与临床密切相关，典型的临床疾病为抗磷脂综合征（APS），分为原发性和继发性，症状有反复动静脉血栓，血小板减少症，如为孕期妇女易出现反复流产，高效价抗体也会引起静脉栓塞，是脑卒中的重要危险因素，多见于 SLE。

（二）泌尿系统常见的抗肾小球基底膜抗体

有抗肾小管、肾小球、肾集合管的抗体，引起肾损害，常见的抗体如抗肾小球基底膜抗体。

[概述]

1919 年美国学者 Goodpasture，首先注意到进行性肺出血与肾小球肾炎相关，1964 年采用间接免疫荧光法发现肾小球处出现线性荧光，这种抗基底膜抗体对应膜上的靶抗原为Ⅳ型胶原蛋白、板层素、蛋白多糖及内肌纤蛋白等，也有部分存在于肺组织黏膜上，导致肺肾出血。

[免疫学检验]

间接免疫荧光法。

[临床意义]

活动性的 Goodpastare 综合征，抗肾小球基底膜抗体阳性率可达 100%，伴有 PR3-ANCA、MPO-ANCA 阳性，一般肺肾综合征或急进性肾小球肾炎阳性率为 15%～20%，具有该抗体患者预后差。

（三）循环系统常见的抗心肌抗体

[概述]

靶抗原为从线粒体膜中分离得到的腺嘌呤核苷酸易位蛋白，相对分子质量为 32 000，还有心肌浆球蛋白，α-肌酸脱氢酶蛋白，热休克蛋白等。

[免疫学检验]

间接免疫荧光法，基质为灵长类心肌组织未固定的冷冻切片，敏感性和特异性都高。

[临床意义]

常见于心肌炎、特发性扩张型心肌病、风湿热及风湿性心脏病、重症肌无

力等检查。

（四）神经系统常见的抗神经元核抗体

［概述］

抗神经元核抗体分成两型：1 型靶抗原是存在于中枢及外周神经系统的所有神经元，也存在于相关肿瘤细胞内，在细胞核中含量要高于细胞浆中，核仁中没有，相对分子质量介于 35 000～40 000 的蛋白质；2 型靶抗原主要存在于中枢神经系统内，相对分子质量为 55 000 和 80 000 的两组蛋白质。

［免疫学检验］

间接免疫荧光法，基质为灵长类小脑和小肠的冷冻组织切片。

［临床意义］

1 型主要见于类瘤性感觉神经病及类瘤性脑脊髓炎，阳性提示可能存在肿瘤，小细胞肺癌的可能性大，也可合并有成神经细胞瘤、前列腺癌、肉瘤，还可见于肌阵挛；2 型主要见于大脑、小脑、脊髓功能紊乱，少见于运动神经病，是乳腺癌和小细胞肺癌的标志之一。

（五）生殖系统常见的抗子宫内膜抗体

［概述］

靶抗原为子宫内膜腺上皮细胞胞液中的一种孕激素依赖蛋白，分七种亚类，在分泌期子宫内膜中含量远高于增殖期，该抗体选择性地和其中几种亚类发生抗原抗体结合，激活补体系统，引起子宫内膜的病理损伤，也干扰受精卵的着床和胚囊的发育，导致不育和流产。

［免疫学检验］

有间接免疫荧光法、双向免疫打散法、间接血凝和 ELISA 法。

［临床意义］

子宫内膜异位症检出率为 74%～82%。效价与疾病转归相关，也作为不孕的筛查项目。

（六）皮肤组织系统常见的抗桥粒抗体

［概述］

是自身免疫性皮肤病的常见抗体，主要靶抗原为桥粒的组分，是相对分子质量为 130 000 和 160 000 的糖蛋白，分为三组，有 Dsg1、Dsg2、Dsg3。

［免疫学检验］

间接免疫荧光法，基质常为猴食管。

［临床意义］

是天疱疮的特异性抗体，效价与病情活动性相关，其他皮肤损伤性疾病效

价较低，诊断尚需结合临床和其他实验技术。

（七）消化系统常见的自身抗体

1. 抗小肠杯状细胞抗体

［概述］

是诊断炎症性肠病的实验指标，主要靶抗原位于杯状细胞浆中，可能是一种相对分子质量为 200 000 的单链多肽。

［免疫学检验］

间接免疫荧光法。

［临床意义］

溃疡性结肠炎患者有高滴度的抗小肠杯状细胞抗体，阳性率为 28%～39%，部分克罗恩病患者也可检出，如与抗中性粒细胞胞浆抗体同时检测，则诊断溃疡性结肠炎的准确性由 28%提高到 72%。

2. 抗胰腺腺泡抗体

［概述］

靶抗原位于胰腺腺泡细胞浆中的微粒体，具体分子特性待阐明。

［免疫学检验］

间接免疫荧光法

［临床意义］

主要见于克罗恩病，检出率为 39%，抗体为 IgG1 亚型，胰腺炎患者可出现低效价的抗胰腺腺泡抗体，高效价提示易发生胰腺外分泌功能损害。如与抗中性粒细胞胞浆抗体同时测定，诊断准确性可提高。

3. 抗肝肾微粒体抗体（LKM）

［概述］

是自身免疫性肝炎的血清学标志，靶抗原分为三种：

（1）LKM-1：细胞色素 P450ⅡD6，为 50 000 的蛋白。

（2）LKM-2：细胞色素 P450 同工酶，药物替尼酸的结合部位。

（3）LKM-3：UDP-葡萄糖醛酸基转移酶，为 55 000 的蛋白。

［免疫学检验］

间接免疫荧光法，三种亚类分别呈现不同的荧光。

［临床意义］

LKM-1 为自身免疫性肝炎Ⅱ型的血清学标志，7%的丙肝患者也可检测到，LKM-3 可见于 10%～15%的慢性丁型肝炎患者，部分自身免疫性肝炎两种亚型都有该抗体。

4. 抗可溶性肝抗原抗体（sLA）

［概述］

靶抗原为肝细胞中的一种可溶性蛋白抗原，相对分子质量为 50 000，在胰腺、肺、肾中也有表达，与抗肝/胰抗体为同一种自身抗体。

［免疫学检验］

ELISA 和蛋白质印迹法。

［临床意义］

对Ⅲ型自身免疫性肝炎具有高度特异性，在Ⅰ型和Ⅱ型中阳性率也可达 58%。

5. 抗平滑肌抗体

［概述］

主要靶抗原是肌肉中的肌动蛋白（actin），以单体或聚合体存在于微丝中。

［免疫学检验］

间接免疫荧光法，一般以大鼠胃肾做基质。

［临床意义］

该抗体是自身免疫性肝炎Ⅰ型的血清标志抗体，检出率>90%，高效价特异性达 100%，低效价常与酒精性肝硬化和病毒性肝炎相关。

（八）内分泌系统常见的自身抗体

1. 抗甲状腺微粒体抗体

［概述］

靶抗原是甲状腺过氧化物酶，含 933 个氨基酸，为 105 000 的血红素糖基化组蛋白，主要位于甲状腺滤泡上皮细胞胞浆中。

［免疫学检验］

间接免疫荧光可见到在滤泡上皮细胞胞浆中呈现颗粒型荧光。

［临床意义］

主要见于自身免疫性甲状腺病：Hashimoto 病（85%～100%）、Graves 病（65%）及原发性黏液性水肿，也见于 1 型糖尿病（14%）以及 Addison 病（31%）。

2. 抗甲状腺球蛋白抗体

［概述］

靶抗原为甲状腺球蛋白（TG），相对分子质量为 660 000，由两个 330 000 的蛋白组成的二聚体。

［免疫学检验］

间接免疫荧光法：可见到甲状腺滤泡腔内网状的荧光。

［临床意义］

（1）自身免疫性甲状腺病：淋巴细胞性甲状腺炎（36%～100%）；原发性

黏液性水肿（72%）；Graves 病（50%～98%）。

（2）自身免疫性内分泌病：糖尿病阳性率（20%）；Addison 病（28%）；恶性贫血（27%）。

（3）甲状腺癌：阳性率为 13%～65%。

3. 抗胰岛细胞抗体

［概述］

靶抗原是胰岛细胞的多种成分，至今未具体阐明，1 型糖尿病是仅针对 β 细胞的，但这些抗原也可少量表达在其他组织。

［免疫学检验］

间接免疫荧光法，基质为灵长类胰腺冷冻组织切片，阳性呈现颗粒或均质型荧光。

［临床意义］

1 型糖尿病中抗胰岛细胞抗体发生率在 90%以上，一般一年后下降，少数持续高效价，正常人也可出现低效价抗体，如效价持续较高，则易患胰岛依赖型糖尿病，同时可伴有抗 GAD 抗体或胰岛素抗体。

第九章　肿瘤标志

第一节　肿瘤标志的临床应用概述

一、定　　义

肿瘤标志是指特征性存在于恶性肿瘤细胞或由恶性肿瘤细胞异常产生的物质或是宿主对肿瘤反应而产生的物质。这些物质存在于肿瘤细胞和组织中，也可进入血液和其他体液，当肿瘤发生、发展时，这些物质明显异常，标示肿瘤的存在。

绝大部分的体液中的肿瘤标志既存在于肿瘤中，也存在于正常人群和非肿瘤病人中，只是肿瘤病人的标志浓度高于非肿瘤病人。唯有 PSA 等几个极少数的肿瘤标志物和特定的器官相关联呈现器官特异性，大多数肿瘤标志物在某一组织类型的多种癌症上呈阳性，但阳性率不一。学术界往往把阳性率较高的一种肿瘤或一类肿瘤看成这一标志的主要应用对象。

二、临 床 应 用

（一）早期发现

早期发现、早期诊断、早期治疗是肿瘤诊治的基本原则。早期发现的肿瘤，体积小，较少转移，届时手术能彻底清除病灶，有效地控制肿瘤，收到事半功倍的效果。为了早期发现肿瘤，人们设想了多种措施和途径，在当前所有的医学手段上，对于无症状的肿瘤病人，肿瘤标志常常是唯一的能早期发现肿瘤的线索。直径 1cm 的肿瘤，大约含有 10^9 个肿瘤细胞，是原始肿瘤细胞倍增 30 次的结果。一个实体瘤从 1 个肿瘤细胞到 10^9 细胞约需 8～18 年。物理仪器的最低检测限是 1cm（10^9 个肿瘤细胞），生化标志最低检测限为 10^8 细胞，理论上，利用生化标志能在亚临床期较早地发现肿瘤。

筛查（screening）是指用快速的实验，将表面健康的人区分为可能患病者（实验阳性者）和可能无病者（实验阴性者）。筛查不具有诊断意义，阳性者必须进一步经临床确诊。当前，由于肿瘤标志物阳性率和特异性都不很高，能用

于普查无症状肿瘤病人的标志只有两个，前列腺特异抗原（PSA）和甲胎蛋白（AFP）。用 AFP 能从人群特别是 HBsAg 阳性、患慢性肝炎病人中筛选原发性肝细胞肝癌。PSA 结合直肠指征普查早期前列腺癌亦在世界各地被广泛应用。虽然今天大多数肿瘤标志物特异性和敏感性都不很高，但它是发现早期无症状肿瘤病人的重要线索，作为肿瘤的辅助诊断工具，广泛应用于临床。针对大量的无症状肿瘤患者，为了及早发现，各地都在试用多标志广谱肿瘤标志物为高龄人群查体，其临床价值正在探索中，为避免假阳性病人造成的负面社会影响，此实验都在有经验的大医院进行，阳性者称高危者，需经临床进一步确诊。

（二）鉴别诊断与分期

肿瘤标志物常用于鉴别良、恶性肿瘤，此时临床已获得足够证据知道患者可能患肿瘤的脏器，肿瘤标志物往往能提供有用的信息帮助区分良、恶性肿瘤。

由于血清标志物的升高水平常和肿瘤的大小和恶性程度有关，肿瘤标志物的定量检测可以有助于临床分期，能判断疾病处于稳定期、进展期或恶化期。

（三）预后判断

一般来说治疗前肿瘤标志物浓度明显异常，表明肿瘤较大，患病较长可能已有转移，预后较差。有人统计结肠癌肿瘤标志物，LD 低于 290U/L，中位生存期 19.3 个月，LD>290U/L 中位生存期 9 个月。另有一些指标专用于观察预后，如乳腺癌的雌激素受体和孕激素受体，如两者阴性，即使 CA15-3 不太高，预后也差，复发机会较高，治疗效果不好。类似的指标还有上皮生长因子受体（EGFR）、癌基因 c-erB-2 编码蛋白（c-erB-2）异常，这些指标阳性都预示较差的预后。

（四）疗效监测

大部分肿瘤标志物的测值和肿瘤治疗效果相关。标志物下降程度反映了治疗成功程度。成功的治疗，如肿瘤的完全切除和有效的放、化疗后，肿瘤标志物应明显下降，下降至正常或治疗前水平的 95%认为治疗成功。如手术或放、化疗后肿瘤标志物未能如预期的下降，说明治疗失败。

（五）复发的指标

肿瘤手术后的病人应每隔 2～3 个月测定一次肿瘤标志，连续至少两年，在未再给予治疗时，连续两次（两个时间间期）以上肿瘤标志物呈直线上升，可认为肿瘤复发。正在治疗的病人，肿瘤标志物的升高，意味疾病恶化。恶化定义为肿瘤标志物测定值增加 25%，为了可靠，2～4 周应再复查一次。有报道，监测了 421 例直肠癌手术后病人，复发者 96 例，其中 64%CEA 升高。

第二节 临床常见的肿瘤标志

一、碱性磷酸酶

在碱性条件下，碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）能水解各种磷酸酯键释放出无机磷，在磷酸基的转移中起重要作用。ALP 及其同工酶相结合，可提高诊断的敏感性和特异性。

1. ALP 升高最常见于原发性和继发性肝癌，ALP 特别是肝型同工酶判断肝癌转移好于其他生化指标。

2. 胎盘型 ALP（PALP）在滋养层合成，怀孕的妇女血清 PALP 升高。这是继 AFP 和 CEA 后发现的胚胎发育期的肿瘤标志物。其升高见于各种癌症，如卵巢癌、胃肠道癌、精原细胞癌和霍奇金病。

3. ALP 骨同工酶（BALP）是判断癌症骨转移的很好标志，ALP 的急剧升高常意味成骨细胞的破坏，ALP 的缓慢升高意味溶骨性损伤，见于乳腺癌转移。

4. 动态观察 ALP 及其同工酶的变化可以有助于判断预后。ALP 正常者预后较好，平均生存期为 38 个月，ALP 异常的平均生存期为 19 个月。

二、乳酸脱氢酶

肿瘤代谢以糖酵解为主，乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LD/LDH）是糖酵解中的主要酶，催化乳酸变成丙酮酸的氧化反应，肿瘤发生时该酶升高，当细胞受到肿瘤侵袭等破坏时，LD 就从细胞中释放出来，血中 LD 水平明显增高。

LD 作为肿瘤标志物有以下特点：

1. LD 的特异性较差，在多种疾病如肾炎、肝炎、心肌损伤，多种肿瘤如肝癌、非霍奇金淋巴瘤、急性白血病、神经母细胞瘤、乳腺癌、非精原细胞瘤型生殖细胞睾丸癌、精原细胞瘤、结肠癌、胃癌和肺癌都能升高；同工酶测定也只能勉强提供一些特定器官浸润的信息。

2. 由于各组织中的 LD 含量较血清高上千倍，微量损伤也足以引起血清 LD 的升高，故敏感性较高。升高的 LD 及其同工酶，可以为早期发现无症状肿瘤病人提供线索。

3. 血清 LD 水平在实质性肿瘤中与肿瘤大小相关，可以用于监测病程，指示预后。但在监测治疗效果方面的价值并不很大。

4. 用于估计癌症患者有无转移和向何处转移，如 LD5 的升高和肝转移相关，当肝癌病人脑脊液 LD5 升高，预示肿瘤向中枢神经系统转移。

三、前列腺特异性抗原

前列腺特异性抗原（prostate specific antigen，PSA）是一种存在于精液中的蛋白酶，几乎全部由前列腺分泌，对诊断前列腺癌意义重大。

正常人 PSA 主要存在于精液中，其浓度（0.5～5.5g/L）约为血清（<0.4μg/L）的 100 万倍，当肿瘤发生时，前列腺和淋巴系统间组织屏障破坏，前列腺内容物进入血液循环，使血中 PSA 升高，每克前列腺癌使血清 PSA 升高 3μg/L。前列腺增生、前列腺炎症也能引起 PSA 轻度升高，每克增生的前列腺可使血中 PSA 升高 0.3μg/L。

血中的总 PSA（t-PSA)包括两种形式，少量为游离 PSA（f-PSA)，大部分则是 f-PSA 和 α_1-抗糜蛋白酶(ACT，相对分子质量 100 000）或 α_2 巨球蛋白（A2M）结合形成的复合物（c-PSA)。

对于前列腺癌，PSA 是一种非常有用的肿瘤标志物，可用于前列腺癌的发现和分期，可以监测治疗效果。PSA 在评价肿瘤发展中也有作用。

单纯的 PSA 并不能很好的筛查和早期诊断前列腺癌。这是由于 PSA 在低浓度时和良性前列腺增生（BPH）有重叠，要在两者之间找一个最适分界点几乎是不可能的。血清 PSA 检查结合直肠指诊和经直肠超声检查要比单纯的直肠指诊更加准确而且灵敏。

为了改善 PSA 早期诊断能力，f-PSA 和 t-PSA 比例具有重要的诊断价值。特别是当 t-PSA 在 4.0～10.0μg/L 时，血清中 f-PSA/t-PSA 比值为 0.15 可作为前列腺肥大和前列腺癌的鉴别要点，比值<0.15 时前列腺癌的可能性大。临床大都应用血清中 f-PSA/t-PSA 比值来鉴别良、恶性前列腺肿瘤。

PSA 与前列腺癌临床分期相关，高水平的 PSA 出现于疾病晚期。PSA 最重要的应用就是监控前列腺癌的确诊后治疗，包括根治性前列腺切除术、放射疗法和抗雄性激素治疗等。PSA 也可用于评价肿瘤进展。

四、人绒毛膜促性腺激素

人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，hCG）是在妊娠期由胎盘滋养细胞分泌的糖蛋白，含 28～30 个氨基酸，相对分子质量 45 000，半衰期 12～20 小时，由 α 和 β 两个亚单位组成，α 亚单位也是其他激素如促卵泡生成素（follice stimulating hormone，FSH)、黄体生成素（luteinizing hormone，LH）和促甲状腺素（throid stimulating hormone，TSH）的组成成分，

β亚单位仅存在于hCG，C-端的28～30个氨基酸有明显的抗原性。β hCG正常参考值上限为5.0 IU/L。正常孕妇在早期β hCG升高，直至分娩后下降。

肿瘤组织分泌的hCG多为β亚单位。100%滋养体瘤和绒毛膜上皮细胞癌β hCG异常升高，可达100万IU/L。β hCG的中度升高见于精原细胞性睾丸癌，70%非精原细胞性睾丸癌β hCG效价升高（往往和AFP同时升高）。部分乳腺癌、胃肠道癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌，良性疾病如肝硬化、十二指肠溃疡、炎症也可见β hCG轻度异常。

由于β hCG无法穿过血脑屏障，所以脑脊液中出现β hCG并且和血清中的β hCG比例超过1∶60，说明肿瘤脑转移。hCG与肿瘤大小有关，可用于监测治疗和滋养层疾病进展，当β hCG用于治疗监测时，建议每周测一次；当hCG高于40万IU/L则认为治疗无效，手术切除肿瘤后hCG会降低。正常血清hCG半衰期约12～20小时，缓降或持续不降提示后遗症存在。化疗期间，建议每周测一次hCG，病情缓解后，每年测一次hCG可检测复发。检测值很重要，因为任何残留的hCG都提示肿瘤发生。hCG β-亚单位检测的特异性也是一个因素，因为低水平的LH和FSH交叉反应也能引起假阳性结果。在肿瘤病人少见其他性激素异常的报道。

20世纪70年代大大改进了hCG的检测方法，用与其他糖蛋白激素LH、FSH和TSH很少有交叉反应的hCG β-亚单位抗体可提高检测的特异性。目前大多数用免疫测定（“夹心”）法检测hCG，当用免疫测定法检测α-和β-亚单位抗体时，可采用完整的（整个分子）hCG，该方法不能检测游离的α或β亚单位，因为游离的α或β亚单位不与抗体形成夹心。总β-hCG测定包括检测完整的（整个分子）hCG和游离的β-亚单位。因为肿瘤病人产生大量游离的β-亚单位，所以总β-hCG可作为肿瘤标记物。

五、激素受体

乳腺癌病人，孕酮和雌二醇水平并无变化，但部分病人孕酮受体（PR）和雌二醇受体（ER）增加。目前测定此两种受体以免疫化学法为主，滴定法、酶联免疫法和免疫细胞化学法（ERICA和PgRICA）测组织提取液。ASCO推荐免疫细胞化学法并认为这是统一标准的方法。正常参考值为>10fmol/mg蛋白质。

根据ASCO建议，乳腺组织细胞质中的雌激素受体和孕酮受体已为乳腺癌诊治的常规项目，60%阳性病人内分泌治疗较有效，95%的阴性病人治疗无效，1/3乳腺癌转移病人雌激素受体较低。临床上发现在用化疗时有一些假阳性的病人，内分泌治疗无效。由于孕酮受体的合成依赖雌激素，孕酮受体检测

是雌激素受体测定的补充，乳腺癌转移病人如果两种受体均阳性，内分泌治疗有效率75%；雌激素受体阳性、孕酮受体阴性者，有效率40%；雌激素受体阴性、孕酮受体阳性者，有效率为25%。临床根据受体测定结果制定相应的治疗方案，内分泌治疗有效者生存期较长，预后较好。

六、甲胎蛋白

甲胎蛋白（alpha-fetoprotein，AFP）是人类认识较早的比较有价值的肝癌和生殖细胞瘤肿瘤标志物，至今已应用了30年。

AFP是一种含4%碳水化合物的单链糖蛋白，相对分子质量70 000，半衰期5天，AFP是胎儿循环中的主要蛋白，最大量约为清蛋白的10%。在胎儿诞生后18个月，白蛋白合成逐渐增加，AFP浓度随之下降，健康成人血清中AFP低于10μg/L，妇女妊娠6个月后AFP可达500μg/L。

良性肝脏疾病如肝炎、肝硬化病人血清中AFP也升高，但95%小于200μg/L，如AFP超过500μg/L，谷丙转氨酶（SGPT）基本正常，意味着存在肝癌。几乎80%肝癌AFP升高，大约一半的肝癌可测到高浓度的AFP。AFP浓度和肝癌大小有关。目前在中国、日本、非洲和阿拉斯加都用AFP普查肝癌。国际学术团体建议参考值上限定在20μg/L。灵敏的AFP检测方法结合超声常常能发现早期肝癌（直径<5cm）。当GPT正常，用AFP来诊断肝癌，可取性100%。AFP还用于治疗监测和预后判断，AFP>500ng/L，胆红素>2mg/L病人存活期很短；病人AFP急剧增长意味肝癌转移；手术后AFP>200ng/L，肝癌组织未完全切除或有转移。

AFP和hCG结合还用于为生殖细胞肿瘤分型和分期。生殖细胞肿瘤可能是以一种细胞为主，也可能是多种细胞如精原细胞瘤型、卵黄囊型、绒毛膜癌成分（胚胎性癌）或畸胎瘤的混合物。精原细胞型AFP正常，β hCG升高；卵黄囊瘤AFP升高，绒毛膜上皮细胞癌的病人hCG升高，而畸胎瘤两者均正常；90%非精原细胞性睾丸癌至少一项升高。其中<20%Ⅰ期病人，50%～80%Ⅱ期病人，90%～100%的Ⅲ期病人两项同时升高。这两个标志的浓度高低也和病情轻重、是否转移有关。以上两种标志物有利于监测生殖细胞癌患者：两项均升高表明疾病复发或转移发生，也可通过用AFP（5天）和hCG（12～20小时）半衰期计算两项降低的范围的方法来评估化疗是否成功。

七、角蛋白

细胞角蛋白（Cytokeratin. CK）是细胞体间的中间丝，在正常及恶性的上皮细胞中起支架作用，支撑细胞及细胞核。已知的角蛋白有20多种，相对分

子质量为 40 000～70 000，已知肿瘤细胞中最丰富的是 CK18 和 CK19，细胞分解后释放至血中。CK19 是一种酸性多肽，相对分子质量为 40 000，主要分布在单层上皮上，如肠上皮、胰管、胆囊、子宫内膜和肺泡上皮，这些细胞癌变时，CK19 含量增加。临床常用的有组织多肽抗原（TrA）、特异性组织多肽抗原（TPS）和细胞角蛋白 19 的片段（CYFRA 21-1）。

Cyfra 21-1，是角蛋白 CK19 的一种，其试剂是从 MCF-7 癌细胞株制备出来的抗 CK19 单克隆抗体，KS19-1 和 BM19-21。这是一个近年来引起高度关注的肿瘤标志物，对肺癌，特别是非小细胞肺癌（NSCLC），有较高诊断价值，敏感性达 80%。它既能做到早期诊断又与瘤块生长、患者生存率、淋巴结受累状态、肿瘤分期等相关，可用于监测疾病进展和术后随访。其诊断鳞形细胞癌、腺癌、大细胞癌的阳性率分别为 67%、46%、67%，远高于 CEA 和其他标志，其假阳性率为 4%～8%，而且 Cyfra 21-1 水平和肿瘤的恶化程度、转移相一致。

组织多肽抗原（tissue polypeptide antigen，TPA）和特异性组织多肽抗原（tissue polypeptide specific antigen，TPS），是比 CEA 和 AFP 出现更早的肿瘤标志物，TPA 是低相对分子质量角蛋白的混合物，TPS 是 TPA 在血中的特异部分，在细胞增殖时，产生大量的角蛋白。当细胞坏死时，角蛋白的可溶部分释放入血。TPA 类的升高表明细胞处于增殖转化期，所以临床上 TPA 更多地被看做细胞增殖的标志。

目前在肿瘤临床上，TPA 主要应用于：

（1）鉴别诊断胆管癌（TPA 升高）和肝细胞癌（TPA 不升高）。

（2）和 CEA 以及糖蛋白类抗原结合判断膀胱癌、乳腺癌、直肠癌、肺癌、卵巢癌有无转移。联合 CEA 和 CA15-3 可诊断乳癌，联合 CEA 和 CA19-9 可诊断结肠癌，联合 CA125 可诊断卵巢癌。TPS 与肺癌细胞增殖活性相关，不论其组织学和肿瘤大小，TPS 升高都与肺癌细胞生长期相关。

八、CA15-3

CA15-3 于 1984 年被发现，相对分子质量为 300 000～500 000。在健康人群，血清 CA15-3 参考值上限为 25kU/L。以此为标准，1050 名正常人中的 5.5%、23%的原发性乳腺癌患者以及 69%的转移性乳腺癌患者的 CA15-3 超过了这一水平。在其他一些恶性肿瘤中也能见到 CA15-3 升高，如 80%的胰腺癌、71%的肺癌、68%的乳腺癌、64%的卵巢癌、63%的直肠癌和 28%的肝癌；CA15-3 升高还可见于一些良性疾病，肝病（42%）和良性乳腺病（16%），但升高比例较低。

由于原发性乳腺癌 CA15-3 升高不显著（23%），因而 CA15-3 常用于转移的乳腺癌病人的治疗监测和预后判断。1997 年美国 FDA 批准 Mucin 1（CA15-3）作为Ⅱ/Ⅲ期乳腺癌复发的检测指标。

CA15-3 比原来水平升高 25%预示病情进展或恶化，并与 90%进展期、78%恢复期相关，60%病情稳定患者的 CA15-3 水平没有改变。由于 CA15-3 对转移性乳腺癌诊断的敏感性和特异性均优于 CEA，因而成为诊断转移性乳腺癌的首选指标。

九、CA125

CA125 是一种高相对分子质量的糖蛋白（>200 000）、含 24%的碳水化合物，表达于卵巢上皮肿瘤和缪勒管来源的病理性和正常组织。

CA125 是卵巢癌的标志物。健康人群血清 CA125 含量很低，其上限为 35kU/L。卵巢癌患者中，50%Ⅰ期、90%的Ⅱ期和超过 90%的Ⅲ期和Ⅳ期病人 CA125 水平升高，其水平和肿瘤大小、肿瘤分期相关。CA125 在鉴别卵巢包块的良恶性上特别有价值。Einhorn 及其同事研究了 100 名腹腔镜诊断为附件明显肿块的患者，其中 23 人属于恶性肿瘤。以 35kU/L 为临界值，恶性肿瘤的预测值为：敏感性为 78%，特异性为 95%，阳性预测值为 82%，阴性预测值为 91%，能协助制订正确的手术方案，而且肿瘤分化不影响 CA125 的水平。

术前 CA125 水平低于 65kU/L 的卵巢癌病人 5 年生存率为 42%，明显高于>65kU/L 病人。术后 CA125 水平及下降的比例对生存率也有预测作用。正常情况下，CA125 的半衰期为 4.8 天。CA125 的半衰期为 22 天的患者比 9 天的患者对化疗的敏感性差。

利用 CA125 还可判断残存肿瘤情况，CA125 估计再手术的敏感性为 50%，特异性为 96%，第一个化疗周期后，CA125 水平可提示疾病的预后，如能降至原来水平的 1/10，表明病情转归良好；三个化疗周期后，CA125 水平持续升高者预后较差。此外 CA125 预测肿瘤复发、转移的精确度为 75%。从 CA125 升高到出现临床症状大约 3～4 个月。80%～90%病例中，CA125 与疾病的预后和转归有关。

CA125 是少数正在试用于普查的肿瘤标志，尚不能用于无症状人群的卵巢癌筛查，也不能用于卵巢癌和其他恶性肿瘤的鉴别诊断。在用化疗时，CA125 会出现假性降低。CA125 常和 CEA 联合测定，计算两者比例比单一标志好，提高检出卵巢癌的敏感性和特异性。

十、CA19-9

CA19-9 是一种高相对分子质量（200 000～1000 000）的糖蛋白混合物，由正常人胰腺、胆管细胞和胃、结肠、子宫内膜及唾液腺上皮合成，血清中它以粘蛋白的形式存在。它和 CEA 的抗原决定簇性质相近，实际上，早期的抗 CEA 多克隆抗体试剂盒也有抗 CA19-9 的抗体。

CA19-9 是结直肠癌和胰腺癌的标志物，CA19-9 已经通过 FDA 的批准，可以用于胰腺癌患者血清的定量检测和辅助监测。Centocor 法检测 CA19-9 正常参考值上限为 37kU/L，99%正常人低于上限值。CA19-9 脏器特异性不强，在各种腺癌中都可升高，如：99%的胰腺癌、67%的肝胆管癌、40%～50%的胃癌、30%～50%的肝癌、30%的结直肠癌以及 15%的乳腺癌，有报道说 10%～20%的良性胰腺炎和胃肠道疾病 CA19-9 均可升高，但其值很少超过 120kU/L。CA19-9 水平还和胰腺癌的临床分期有关，在 37～1 000kU/L 时，有 67%的病人可经手术切除，当 CA19-9＞1 000kU/L 时仅有 5%病人可以手术。CA19-9 有助于胰腺癌和结直肠癌的监测，其水平升高预示着肿瘤复发，比超声和临床诊断早 1～7 个月。

十一、CA242

CA242 抗体来自于人大肠癌细胞株 COLO205，可识别 CA50 和 CA19-9 的抗原决定簇。其抗原决定簇是一种唾液酸化的碳水化合物。CA242 表达于人胰腺导管细胞的上缘和结肠黏膜的上皮和杯状细胞。

CA242 是胰腺和大肠癌的标志。以 20kU/L 为临界值，CA242 升高见于：5%～33%的结肠、胃、肝、胰腺及胆管的良性疾病，68%～79%的恶性胰腺癌，55%～85%的大肠癌和 44%的胃癌。大肠、肝、胰腺及胆管疾病 CA242、CA50 和 CA19-9 的相关系数在 0.81～0.95 之间，三者作用十分相似，比较起来 CA19-9 的敏感性和特异性都好一些，更为常用。大肠癌患者 CA242 和 CEA 升高的百分比高于 CA19-9 和 CA50。

十二、CerbB-2 基因蛋白

CerbB-2 基因又称为 HER-2/neu 基因，它属于 src 癌基因家族，和表皮生长因子受体（EGFR）同源，在结构和功能上都和 EGFR 相似，能激活酪氨酸激酶。它的表达蛋白为 p185，相对分子质量 185 000。ErbB-2 基因通过基因扩增而激活，它多见于乳腺癌（Paget 病）、卵巢癌和胃肠道肿瘤。虽然 CerbB-2 基因蛋白在诊断乳腺癌中的阳性率不高，仅 25%～30%，但它在乳腺癌诊断

中特别有价值，它和肿瘤的大小、雌激素受体、孕酮受体一样可判断病人的预后，在乳腺癌诊断中被看做一个独立的指标。CerbB-2 基因蛋白增加病人预后较差，极易复发，存活期短。在卵巢癌 CerbB-2 升高和增强的肿瘤侵袭性、较高的临床分级以及较差的结局相关。

十三、唾液酸和唾液酸酰基转移酶

唾液酸（sialic acid，SA）是细胞膜糖蛋白的重要组成部分，与细胞恶变、癌转移、浸润、失去接触性抑制、细胞粘附性降低以及肿瘤抗原性密切相关。唾液酰基转移酶（sialyltrnsferase，ST）是神经节苷脂（ganglioside）成分之一，它催化 N 一乙酰神经氨酸（即唾液酸）转移至糖蛋白或糖脂受体上，与细胞膜形成和维持正常功能有关，在肿瘤发生时，血中唾液酸和唾液酸酰基转移酶浓度都会升高。

早在 1976 年就发现多种肿瘤细胞表面的唾液酸糖蛋白 SA 活性升高，最高值为对照组的 4 倍，并和肿瘤的浸润、转移有关。后来人们发现唾液酸又称为总唾液酸（TSA），其中脂结合唾液酸（LSA）更敏感、更特异，应用更多。有三种唾液酰基转移酶和肿瘤有关：脂质唾液酰基转移酶（LASA），糖蛋白结合酰基转移酶（GPSA）以及游离唾液酰基转移酶（FSA）。GPSA 的敏感性和特异性高于其他唾液酸成分，但由于分离和提纯较困难，目前临床常测定的唾液酸酰基转移酶多为 LASA 和 GPSA 混合物称为唾液酸酶。FSA 由于目前尚无灵敏的检测方法因而临床较少使用；TSA、LSA 和 LASA 都是临床上常用的肿瘤标志，其临床价值近似。据报道，患肺癌、乳腺癌、子宫颈癌、胃肠道肿瘤、耳鼻咽喉癌、血液系统肿瘤病人血和尿中的 TSA 和 LASA 浓度均见升高，但阳性率报道不一，介于 61%～80%之间，假阳性率为 12%～21%，主要见于风湿性关节炎等胶原系统疾病和肝脏疾病。由于唾液酸和多种肿瘤有关，临床常把唾液酸看成广谱肿瘤标志，和其他标志结合，提高诊断的敏感性和特异性。

第十章　传染病的免疫学检验

第一节　甲型病毒性肝炎

甲型病毒性肝炎（甲肝）由甲型肝炎病毒（hepatitis A virus，HAV）引起。本病早年曾称为传染性肝炎，主要由患者粪便中的 HAV 污染食物或水源而引起流行。1988 年我国上海居民因食用被 HAV 污染的毛蚶而暴发甲肝流行，罹患者达 31 万人，危害严重。

［概述］

1. 甲型肝炎病毒　1973 年由 Feinstone 等用免疫电子显微镜技术从甲肝患者粪便中发现，现列于小 RNA 病毒科、肝病毒属。病毒颗粒为球形，直径 27～32nm，没有包膜。易感动物为人和黑猩猩、恒河猴、狨猴等灵长类动物。HAV 能在多种灵长类动物细胞中增殖和传代，如恒河猴胚肾细胞（FRh46），Buffalo 绿猴肾细胞（BGMK）等。对理化因素抵抗力较强，在 pH 3.0 及有机溶剂如乙醚、氯仿中稳定，60℃条件下可存活数小时，用于处理饮用水的氯浓度达 0.2～0.3mg/L 才能有效杀灭 HAV。在水、泥沙和毛蚶中可存活数日至数月。

2. 传播　主要经粪-口途径传播。患者在潜伏期末和发病早期随粪便大量排出 HAV，可污染水源、食品以及各种用具。易感者通过食入未严格灭毒的水或食物而发病，也可因手指接触污染的器具，再经口感染。经输血传播的甲肝病例也有报告，但很少。苍蝇和蟑螂是重的传播媒介。

3. 临床表现　HAV 主要感染青少年。多数为亚临床感染，少数为急性肝炎，表现乏力，食欲不振，肝区痛，腹胀，肝大，皮肤和巩膜黄染等。绝大多数患者可完全恢复，不转为慢性或长期病毒携带者。

4. 实验室诊断　甲肝患者依病情轻重肝功能可有不同程度的损伤，血胆红素水平和丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）活性均可显著升高。但甲肝确诊有赖于抗 HAV-IgM 抗体测定。从粪便中检测 HAV 抗原、用斑点杂交或用 PCR 法测定血清中 HAV RNA 很少应用。

［免疫学检验］

诊断甲肝的特异性血清学指标是抗 HAV 的 IgM 类抗体（抗 HAV-IgM）。

抗 HAV-IgM 测定目前普遍采用 ELISA 法。商品试剂盒多为 ELISA 捕获法。其原理是用抗人 μ 链单克隆抗体包被固相载体（如聚苯乙烯反应板微孔），在加待测血清至微孔中时，血清中的 IgM 可被抗 μ 链抗体捕获。再加入纯化的 HAV 抗原，被捕获的 IgM 中如有抗 HAV-IgM，即可与加入的 HAV 结合。洗涤后加入酶（如 HRP）标记的抗 HAV 抗体，温育并洗涤，固相上形成抗 μ 链抗体-患者血清的 IgM（含抗 HAV-IgM）-HAV-酶标记抗 HAV 抗体复合物。在加入酶底物/色原溶液时出现呈色反应，呈色强度反映患者血清中抗 HAV-IgM 水平。一般试剂盒规定以待测血清的吸光度（A）和阴性对照血清的平均吸光度（A）的比值（P/N 比值）≥2.1 为阳性。

［参考值］

正常人抗 HAV-IgM 阴性（P/N 比值<2.1）。

［结果分析与临床意义］

感染 HAV 发病 1～2 周后，患者血清中即出现抗 HAV-IgM 抗体，并在病后 2～3 周达到高峰，1～2 个月开始下降，病后 3 个月基本消失。因此，抗 HAV-IgM 是公认的诊断甲型肝炎的特异指标，抗 HAV-IgM 阳性提示新近感染了 HAV，结合临床和流行病学资料，可作为甲肝诊断标准。

抗 HAV 的 IgG 类抗体（抗 HAV-IgG）一般不作为常规检验项目。该抗体通常在病后 3～12 周出现于患者血清中，效价缓慢上升，6 个月后达高峰，以后逐渐下降，但持续多年，可终生存在。一般用于流行病学调查，作为既往感染 HAV 的指标。

第二节　乙型病毒性肝炎

由乙型肝炎病毒（HBV）引起的乙型肝炎在 20 世纪 60 年代以前曾称为血清性肝炎。1965 年前后，Blumberg 和 Prince 分别从输血相关的肝炎患者血液中发现了 Au 抗原和 SH 抗原，这两种抗原即 HBV 的表面抗原（HBsAg）。这些开拓性的工作为乙型肝炎的病毒学、流行病学、临床学研究奠定了基础。

我国为乙型肝炎的高流行区，一般人群的 HBsAg 阳性率为 9.09%。近年来乙型肝炎的发病率和病死率一直高居于我国 27 种法定报告的甲、乙类传染病中的前 5 位。据推算我国现有慢性 HBV 感染者 1.2 亿人，慢性乙型肝炎（CHB）患者约 3 000 万人。CHB 发展为肝硬化的年发生率约为 2.1%，对 HBeAg 阴性 CHB 患者长期随访发现，患者中 23%发展成肝硬化，4.4%发展成原发性肝细胞癌。

为了规范和指导我国 CHB 的防治工作，中华医学会肝病学分会和感染病学分会已于 2005 年 12 月联合发布了《慢性乙型肝炎防治指南》，卫生部也于 2006 年 1 月颁布了《2006～2010 年全国乙型病毒性肝炎防治规划》。

［概述］

1. 乙型肝炎病毒　HBV 属嗜肝 DNA 病毒科（Hepadnaviridae），有感染肝细胞的强烈倾向。完整的 HBV 是双壳颗粒，直径 40～42nm。除完整病毒颗粒外，HBV 感染的细胞还产生两种不同的亚病毒脂蛋白颗粒：20nm 的球形颗粒和 20nm 的丝状颗粒。这些颗粒是不含病毒核心只含包膜糖蛋白和宿主细胞脂质的 HBsAg。

HBV 基因组是长约 3.2 kb 的部分双链环状 DNA，有 4 个长的开放读码框（ORF），即前 S/S 区：编码前 S1（preS1）、前 S2（preS2）和 HBsAg 三种包膜糖蛋白；前 C/C 区：编码 HBeAg 和 HBcAg；P 区：编码聚合酶；X 区：编码 X 蛋白。

侵入人体后，HBV 与肝细胞膜上受体结合，脱去包膜，进入肝细胞浆内，其部分双链环状 DNA 再移入细胞核内，经宿主酶作用，修复形成共价闭合环状 DNA（cccDNA），成为病毒 mRNA 转录模板。由此产生的病毒 mRNA 进入肝细胞浆被翻译，生成 HBV 的表面、核心、聚合酶蛋白和 X 蛋白。cccDNA 半衰期很长，很难从体内彻底清除。

前 C 区和基本核心启动子（BCP）的变异可以产生 HBeAg 阴性的 HBV 变异株。例如，前 C 区 G1896 点突变，形成终止密码子（TAG），使 HBeAg 不能表达；BCP 区的 A1762T/G1764A 联合点突变可抑制前 C mRNA 转录，从而抑制 HBeAg 的合成。这是 HBeAg 阴性 CHB 产生的主要原因。在拉米夫定治疗过程中，HBV 的 P 基因也会发生变异，最常见的是导致 YMDD（酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸）变异，由 YMDD 变成 YIDD（蛋氨酸→异亮氨酸）或 YVDD（蛋氨酸→缬氨酸），以致对拉米夫定产生耐药。S 基因变异可导致隐匿性 HBV 感染：血清 HBsAg 阴性，HBV 仍低水平复制。

HBV 复制对肝细胞并没有直接的细胞毒作用，这是很多 HBV 携带者肝损伤很轻，也无临床症状的主要原因。宿主对受染肝细胞上 HBV 抗原的免疫清除是肝细胞发生损伤的主要机制。

2. HBV 主要经血和血制品、母婴、破损的皮肤和黏膜以及性接触的方式传染　原发感染时经过 4～10 周潜伏期出现病毒血症，血中可测出 HBsAg，不久后可测出抗 HBc（早期主要为 IgM 类）和 HBeAg。当后者出现时，75%～100%的肝细胞已感染 HBV。成人的原发性感染多为自限性的，但有

5%～10%的人发展为慢性感染（持续 6 个月 HBV 仍未被清除）。围生期感染或婴幼儿时期感染者中则分别有 90%和 25%～30%发展为慢性感染。慢性 HBV 感染一般分为免疫耐受期（HBV 复制活跃，HBsAg、HBeAg 阳性，HBV DNA 滴度高，ALT 和肝组织学检查均正常），免疫清除期（主要表现为 ALT 和 AST 升高，肝组织有坏死炎症），非活动期（HBeAg 转阴，抗 HBe 阳性，HBV DNA 检测不到，ALT、AST 和肝组织学检查正常）。在非活动期患者中，有一部分可再次活动。应注意 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎，其特点是 HBeAg 阴性但 HBsAg 阳性，HBV DNA 有较高效价（$\geqslant 10^5$ 拷贝/ml）；血清 ALT 持续或反复异常，肝组织学检查有炎症改变。

3. 乙型肝炎的实验室诊断

（1）生化学检查：包括酶学检查如丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）水平升高，反映肝细胞损伤；胆碱酯酶（ChE），肝脏合成拟胆碱酯酶（PChE），故血清 ChE 水平降低提示肝合成功能障碍。胆红素测定：胆红素（直接与间接胆红素）水平反映肝细胞坏死程度。严重肝病时酶胆分离，胆红素持续升高而酶水平反而正常或下降。凝血酶原时间测定：凝血酶原时间（prothrombin time，PT）是检测外源性凝血因子有无缺陷的筛查指标，常用凝血酶原时间比值（PTR）或国际标准化比值（INR）表示。PTR［待测血浆的 PT（s）/正常参比血浆的 PT（s）］的正常参考值为 1.0±0.05；INR 是指用来测定 PT 的试剂凝血活酶（因子Ⅲ）经国际敏感指数（ISI）标定，所得 PTR 即 INR。PT 延长提示肝细胞受损伤，合成凝血因子的功能障碍。血清总蛋白、清蛋白与甲胎蛋白（AFP）测定：肝功能受损伤时，合成清蛋白减少，血清总蛋白、清蛋白水平降低，清蛋白/球蛋白比值下降。AFP 升高可用于监测肝细胞肝癌，但也见于肝细胞大量坏死后的肝细胞再生。肝纤维化指标：包括透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN）、Ⅳ型胶原（ⅣC）、Ⅲ型前胶原（PCⅢ）等。血清中水平升高反映肝纤维化进展。

（2）HBV DNA 测定：常用实时荧光定量 PCR 法。检测低限可达 10^2 拷贝/ml。可用以了解乙型肝炎患者的 HBV 复制水平，判断治疗效果和预后，还可用于隐匿性慢性乙型肝炎（血清 HBsAg 阴性但 HBV DNA 阳性）诊断。HBV 的共价闭合环状 DNA（cccDNA）是 HBV 持续感染的关键，可用定性的实时荧光 PCR 法测定，目前尚未常规开展。

（3）HBV 血清标志物测定：目前常用酶联免疫吸附实验（ELISA）、化学发光免疫分析（CLIA）、时间分辨免疫荧光分析（TrFIA）和微粒子酶免疫分析（MEIA）测定 HBV 表面抗原（HBsAg），抗表面抗原抗体（抗 HBs），抗核心抗原抗体（抗 HBc），HBV e 抗原（HBeAg），抗 e 抗原抗体（抗 HBe）

共 5 项指标。

［免疫学检验］

免疫学检验的项目为 HBV 的血清学标志物，即 HBsAg、抗 HBs、HBeAg、抗 HBe 和抗 HBc（IgM/IgG 类）。检测的方法中，化学发光免疫分析（CLIA）、时间分辨免疫荧光分析（TrFIA）和微粒子酶免疫分析（MEIA）均使用专用仪器和配套试剂，自动化操作，由仪器直接打印检测结果。目前最广泛应用的是 ELISA 法。不同厂家生产的试剂盒检测原理、步骤和报告方式均不相同，此处介绍的是常用方法。

1. HBsAg 测定　用双抗体夹心 ELISA 法。将纯化的抗 HBsAg 抗体（多克隆或单克隆抗体）包被聚苯乙烯反应板微孔，加入待测血清，如含有 HBsAg，温育后即可与包被的抗 HBsAg 抗体结合，洗去未反应物，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗 HBsAg 抗体，温育，洗涤，固相上形成抗 HBsAg 抗体-HBsAg-HRP 标记抗 HBsAg 抗体复合物，加入酶底物/色原呈色。呈色强度与待测血清中 HBsAg 水平呈正比。

2. HBeAg 测定　用双抗体夹心 ELISA 法。包被抗体和 HRP 标记抗体均为纯化的多克隆或单克隆抗 HBeAg 抗体。原理与操作步骤同 HBsAg 测定。

3. 抗 HBs 测定　目前多用双抗原夹心 ELISA 法。将纯化的 HBsAg 包被于聚苯乙烯反应板微孔，加入待测血清，如含有抗 HBs 在温育后即可与包被的 HBsAg 结合。洗去未反应物，加入酶（HRP）标记 HBsAg，温育，洗涤，固相上形成 HBsAg-抗 HBs-HRP 标记 HBsAg 复合物，加入酶底物/色原呈色。呈色强度反映待测血清中抗 HBs 水平。

4. 抗 HBe 测定　用 ELISA 竞争法。用纯化的抗 HBeAg 多克隆或单克隆抗体包被反应板微孔，加入待测血清和标化的中和试剂（HBeAg），温育，洗涤。待测血清中如含有抗 HBe，可与包被抗体竞争结合中和试剂中的 HBeAg，即待测血清中抗 HBe 含量越高，与 HBeAg 结合的就越多，HBeAg 与包被抗体结合的就越少。加入酶（HRP）标记抗 HBeAg 抗体，温育、洗涤，固相上形成抗 HBeAg 抗体-HBeAg-HRP 标记抗 HBeAg 抗体复合物（待测血清中抗 HBe 与 HBeAg 形成的复合物已被洗去），加入酶底物/色原呈色。呈色强度与待测血清中抗 HBe 水平呈反比。

5. 抗 HBc 测定　用 ELISA 竞争法。所测为待测血清中总的抗 HBc，主要是 IgG 类抗 HBc。包被抗体和酶（HRP）标记抗体都用单克隆或多克隆抗 HBcAg 抗体，标化的中和试剂为 HBcAg。原理、操作步骤与结果分析同抗 HBe 测定。

6. 抗 HBc-IgM 测定　用 ELISA 捕获法。所测为 IgM 类抗 HBc。用抗人

μ链抗体包被反应板微孔，捕获待测血清中的IgM至固相，温育，洗涤后加入纯化的HBcAg。如捕获的待测血清IgM中有IgM类抗HBc，可与HBcAg结合，后者又与随后加入的酶（HRP）标记抗HBcAg抗体结合，温育，洗涤后固相上形成抗μ链抗体-IgM类抗HBc-HBcAg-HRP标记抗HBcAg抗体。加入酶底物/色原时出现呈色反应，呈色强度与待测血清中IgM类抗HBc水平呈正比。

[参考值]

ELISA测定HBV血清标志物的结果常用P/N（待测血清吸光度值/阴性对照吸光度值）比值表示（竞争法用N/P比值）。以P/N≥2.1（竞争法N/P≥2.1）为阳性。有的试剂盒用S/CO（待测血清吸光度/cut off值）比值表示。所谓cut off值即阴性对照的平均吸光度×2.1。一般以S/CO≥1.0为阳性（竞争法以S/CO<1.0为阳性）。

如以P/N比值表示时，正常人血清HBsAg、HBeAg、抗HBs、抗HBc-IgM均<2.1；抗HBe和抗HBc N/P值均<2.1。

如以S/CO比值表示时，正常人血清HBsAg、HBeAg、抗HBs、抗HBc-IgM均<1.0；抗HBe和抗HBc S/CO值均>1.0。

[结果分析与临床意义]

1. HBV血清标志物的测定，必须用经国家食品药品监督管理局批准的试剂盒。但即使如此，由于各厂家试剂盒中所用的抗原、抗体成分不同，检测原理不同，因此不同厂家的试剂盒测定同一患者可能得出不同的结果。

2. HBV血清标志物测定的意义

（1）HBsAg：阳性表示HBV感染。但应注意隐匿性慢性乙型肝炎患者血清HBsAg为阴性，血清/肝组织中HBV DNA阳性，抗HBs、抗HBe、抗HBc可以阳性。

（2）HBeAg：阳性提示HBV复制和传染性高。但应注意HBeAg阴性的慢性乙肝患者，血清HBsAg、HBV DNA均阳性，ALT也反复异常。这些患者HBV仍在复制，需积极的抗病毒治疗。

（3）抗HBs：为保护性抗体。阳性提示对HBV已产生免疫力，见于乙型肝炎患者康复期和接种过乙型肝炎疫苗者。

（4）抗HBe：HBeAg转阴而抗HBe转阳，称为HBeAg血清学转换。除因前C区突变使HBeAg转阴者之外，提示患者趋于康复，HBV复制水平低。

（5）抗HBc：抗HBc-IgM阳性多见于乙型肝炎急性期，提示HBV复制。总抗HBc主要是抗HBc-IgG，只要感染过HBV，无论病毒是否被清除，此抗体均可阳性。

第三节　丙型病毒性肝炎

丙型病毒性肝炎（丙肝）早年曾称为血清性肝炎，因其发生于输注血液或血制品后，故名，以区别于经粪-口途径感染的传染性肝炎（现称甲型病毒性肝炎）。1974 年 Golafield 将其称为输血后非甲非乙型肝炎，1989 年 Choo 等用分子克隆技术获得本病病原的病毒基因克隆，命名为丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）。

据世界卫生组织（WHO）1999 年统计，全球人口中约 3%（1.7 亿人左右）感染了 HCV，每年新增感染人数约 300 万～400 万。我国 HCV 感染率为 3.2%。全球输血后肝炎中，丙肝占 90%以上（我国为 60%～80%），散发性急性病毒性肝炎中，丙肝占 10%～25%（我国为 12%～24%）。在美国，1999 年丙肝病死率单独报告，占全部肝病死亡人数的 77%；1998 年与 HCV 感染相关的直接医疗费用超过了 10 亿美元。

［概述］

1. 丙型肝炎病毒　HCV 为黄病毒科丙型肝炎病毒属的单链 RNA 病毒。病毒颗粒为球形，直径 30～60nm，有含脂质的蛋白质囊膜，对有机溶剂（乙醚、氯仿等）敏感，煮沸、紫外线照射、甲醛处理均可使 HCV 灭活。迄今证实的易感动物为黑猩猩。树鼩（tree shrew）有可能代替黑猩猩作为感染动物模型。根据核苷酸序列同源程度，HCV 可分为 6 个（1～6）主要基因型，各型又由若干亚型（a、b、c）组成，如 1a、1b、2a、2b、3a、3b 等。中国内地北方以 2a（3）型为主，南方以 1b（2）型为主。

2. 传播　主要传播途径是输注 HCV 污染的血液或血制品（抗血友病因子，丙种球蛋白等）、静脉注射毒品（用污染的注射器）、血液透析和单采血浆（回输血细胞成分）等。性传播和母婴传播也为次要传播途径。

3. 临床表现　HCV 感染者中，80%无明显的临床症状，故 2000 年 7 月，美国卫生总署（Surgeon General）宣布，丙肝是一种“沉默的”流行病。少数患者可有发热，肝脏大，轻度黄疸。目前认为，有 70%～85%的丙肝患者可转为慢性。自然感染史长，感染 20～30 年后 10%～20%的患者可发展成肝硬化，1%～5%的患者发展成肝癌。因此，HCV 感染者是肝硬化、肝癌的高危人群。

4. 实验室诊断　丙型肝炎患者可有血清胆红素水平、丙氨酸氨基转移酶（ALT）和天冬氨酸氨基转移酶（AST）活性的升高。由于血中 HCV 含量低，分子杂交法难以检出，常用逆转录套式（巢式）聚合酶链反应扩增患者血清中

HCV RNA。由于技术条件要求较高，仅用于 ELISA 法抗 HCV 抗体测定阳性，但重组免疫印迹分析（RIBA）不能确诊者；疑为急性 HCV 感染但 ELISA 法测定抗 HCV 抗体阴性者以及用于慢性丙肝患者毒血症的确定。HCV RNA 的定量测定可评估对治疗的反应。目前实验室常规开展 ELISA 法测定抗 HCV 抗体，主要用于高危人群筛查和初步诊断。无症状者、低危人群或献血员如抗 HCV 抗体阳性需进一步做 RIBA 确认。

［免疫学检验］

1. ELISA 法测定抗 HCV 抗体　将 HCV 的基因重组抗原和人工合成多肽抗原按最佳比例组合后包被聚苯乙烯反应板微孔，加入待测血清温育，待测血清中如含有抗 HCV 抗体可与包被抗原结合，洗涤后再加入酶（如 HRP）标记抗人 IgG 抗体，温育并洗涤，固相上形成 HCV 抗原-抗 HCV 抗体（待测血清）-HRP 标记抗人 IgG 复合物，在加入酶底物/色原溶液时出现呈色反应，呈色强度（用吸光度表示）反映待测血清中抗 HCV 抗体水平。一般以待测血清吸光度（*A*）值高于阴性对照平均 *A* 值的 2.1 倍即 P/N 比值≥2.1 为阳性。

2. ELISA 法测定 HCV 抗原　这是一种新开展的检测患者血清中 HCV 核心抗原的双抗体夹心 ELISA 法〔聚苯乙烯反应板微孔上最终形成包被的抗 HCV 抗体——HCV 核心抗原（待测血清）-酶标记抗 HCV 抗体复合物〕，阳性结果能早期诊断丙型肝炎，敏感性和特异性都高，但还缺乏广泛的临床应用验证。

［参考值］

正常人血清抗 HCV 抗体或 HCV 核心抗原均阴性（P/N 比值<2.1）。

［结果分析与临床意义］

HCV 感染后，血清中可出现特异性抗 HCV 抗体。IgM 类抗体（抗 HCV-IgM）过去曾用于丙肝的早期诊断，但因检测方法不成熟，临床意义不明确，现已不再常规开展。目前作为丙肝常规筛查的特异性指标是抗 HCV-IgG。

检测抗 HCV-IgG 的 ELISA 试剂盒由第一代、第二代、第三代不断升级，主要反映在试剂盒中包被用的 HCV 抗原不断改进，使检测的敏感性和特异性不断提高。绝大部分抗 HCV-IgG 阳性者，血清 HCV RNA 均阳性，故抗 HCV-IgG 阳性是判断 HCV 感染的重要标志。

有极少数 HCV 感染者，抗 HCV-IgG 阴性（但血清中可测出 HCV RNA），也有极少数非 HCV 感染者抗 HCV-IgG 阳性，需用 RIBA 或巢式逆转录 PCR（测定 HCV RNA）进行确认。

第四节　戊型病毒性肝炎

由戊型肝炎病毒（hepatitis E virus，HEV）感染所致的戊型病毒性肝炎（戊肝），在发展中国家是常见传染病之一。戊肝主要经含 HEV 粪便污染的水或食物通过粪-口途径传播，可引起暴发流行，也可引起散发型急性病毒性肝炎。1983 年 Balayan 用免疫电镜技术首次从戊肝患者粪便中发现直径 27nm 的病毒颗粒。1988 年 HEV 被正式确认为经肠道传播的非甲非乙型肝炎（后称戊肝）的病原。

［概述］

1. 戊型肝炎病毒　HEV 为无包膜的球形颗粒，直径 27～34nm，基因组为 7.5～7.6kb 的单股正链线状 RNA。属杯状病毒科。世界各地分离的 HEV 毒株可能有不同的基因型。HEV 的易感动物为人、黑猩猩、食蟹猴等灵长类动物和家猪。可用人胚肺二倍体细胞进行培养。

2. 临床表现　戊肝为急性、自限性疾病，可有亚临床感染。临床表现与甲型肝炎类似。在黄疸前期和黄疸期可有毒血症。黄疸期开始从粪便排毒。临床症状最常见于青、中年患者，儿童多表现为亚临床感染。在戊肝流行区患病人群总死亡率约为 2%。孕妇感染 HEV 后死亡率可高达 20%，且易致死胎或流产。

3. 实验室诊断　除常规检查血清胆红素、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）等肝功能指标外，对戊肝患者也可用逆转录套式聚合酶链反应测定血清或粪便中 HEV RNA。但由于病毒血症时间仅 1 周左右，粪中排毒时间也短，主要是在急性期早期，加以技术条件要求较高，本法未用作常规检测方法。目前常规开展的项目主要为用 ELISA 法检测患者血清中抗 HEV IgG 类抗体（抗 HEV-IgG）。

［免疫学检验］

用人工合成或基因重组的 HEV 多肽抗原包被聚苯乙烯反应板微孔，加入待测血清温育。如血清中含有抗 HEV 抗体，即与固相上抗原结合。清洗后加入酶（如 HRP）标记的抗人 IgG 抗体，温育、清洗后固相上形成 HEV 抗原-抗 HEV 抗体（待测血清）-酶标记抗人 IgG 复合物。在加入酶底物/色原溶液后即产生呈色反应，呈色强度与待测血清中抗 HEV-IgG 水平成正比。一般试剂盒规定以待测血清吸光度与阴性对照血清吸光度比值（P/N 比值）≥2.1 为阳性。

［参考值］

正常人血清抗 HEV-IgG 阴性（P/N 值<2.1）。

[结果分析与临床意义]

抗 HEV 抗体以 IgG 类抗体（抗 HEV-IgG）为主，在戊肝急性期即可检出（发病 2 周内阳性率可达 97.8%），效价较高，持续约 6 个月左右。一般认为，戊肝急性期首份血清抗 HEV-IgG 效价≥40，以后采集的血清效价逐步下降；或最初采集的血清抗 HEV-IgG 为阴性，以后采集的血清转为阳性；或连续采集的血清抗 HEV-IgG 效价逐步升高，都可诊断为急性 HEV 感染。

由于不同厂家出售的试剂盒，所用的包被固相载体的 HEV 抗原常常不同，有时不能覆盖所有的引起感染的 HEV 毒株，因此不同试剂盒检测的结果可能会有差异。此外，约有 10%左右的戊肝患者，始终测不出抗 HEV-IgG，可能他们感染的是新的 HEV 基因型，也可能是这些患者免疫应答能力低下，对 HEV 感染未产生特异抗体。

抗 HEV-IgM 因为效价不高，而且部分患者感染 HEV 后始终不出现 IgM 类抗 HEV 抗体，发病 2 周内抗 HEV-IgM 的总阳性率仅 71.1%，低于抗 HEV-IgG 的阳性率，故目前已不将抗 HEV-IgM 列入常规检测项目中。

第五节 艾 滋 病

艾滋病（AIDS）是由人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）引起的一种全身性传染病，全称为获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome，AIDS）。1981 年美国疾病控制中心（CDC）报告首例艾滋病患者。2005 年 11 月 21 日联合国艾滋病规划署（UNAIDS）和世界卫生组织报告，2005 年全球 HIV 感染者总人数为 4 030 万人，2005 年新增 HIV 感染者 490 万人，因该病死亡 310 万人。2006 年 1 月 24 日公布的由我国卫生部、UNAIDS 和 WHO 共同完成的《2005 年中国艾滋病疫情与防治工作进展》报告，至 2005 年年底，我国现有 HIV 感染者和艾滋病患者约 65 万人（54 万～76 万人），其中艾滋病患者约 7.5 万人（6.5 万～8.5 万人）。2005 年新发生的 HIV 感染者约 7 万人（6 万～8 万人），因艾滋病死亡约 2.5 万人，在中国 27 种甲、乙类法定报告传染病的死亡人数中居第 4 位。

[概述]

1. 人类免疫缺陷病毒（HIV） 分 HIV-1 和 HIV-2 两型。属于逆转录病毒科（Retroviridae）、慢病毒属（*Lentivirinae*），灵长类免疫缺陷病毒亚属，该亚属包括 HIV-1、HIV-2 和猴免疫缺陷病毒（simian immunodeficiency virus，SIV）。HIV-1 由法国巴斯德研究所（1983 年），美国国立卫生研究院和加州大学旧金山分校（1984 年）分离，起源于黑猩猩猴免疫缺陷病毒

(SIVcpz)，分 A～J、N、O 共 12 个亚型，所致感染者全球分布。HIV-2 1984 年于肯尼亚比绍分离，起源于乌黑色白脸猴免疫缺陷病毒（SIVsmm），至少有 A～F 6 个亚型。主要在西非引起感染流行。

HIV 是直径 100～120nm 的球形颗粒，最外层是脂质双层组成的包膜糖蛋白，其内为 20 面体对称的核衣壳，最内层为核心，位于病毒体中央或偏心，内含病毒核酸、逆转录酶、RNA 酶、聚合酶及 P7 等蛋白质。

HIV 的基因组为 2 拷贝的单股正链 RNA 形成的二聚体，HIV-1 基因长约 9.8kb，含 3 个结构基因：gag 基因编码核心蛋白，包括核心蛋白 P17、核衣壳蛋白 P24（HIV-2 与之相当的是 P32）和核酸结合蛋白 P15；pol 基因编码位于病毒核心区的聚合酶蛋白，如 P66（逆转录酶）、P31（整合酶）等；env 基因编码包膜蛋白，糖蛋白 gp160 是前体分子，由突出于病毒颗粒表面的外膜糖蛋白 gp120 和跨膜糖蛋白 gp41 栓部（插于脂质膜中）构成。gp120 是淋巴细胞、单核-吞噬细胞上 CD4 分子的配体，与 CD4 结合后使 gp41 插入靶细胞膜中，是 HIV 侵入细胞的主要机制。HIV-2 与之相当的是 gp110/130 和 gp36。

2. 传播途径　艾滋病的传染源是患者和 HIV 无症状携带者。他（她）们的血液、尿液、唾液、精液、脑脊液、乳汁、阴道分泌物中均已分离到 HIV。主要传播方式为性接触（同性或异性）；注射吸毒（输入含 HIV 的血液或血制品，器官移植或骨髓移植，人工授精，医源性传播）；母婴传播（经胎盘、产道或哺乳）。我国 2005 年新发生的 HIV 感染者中，经性传播者占 49.8%，经注射吸毒传播占 48.6%，母婴传播占 1.6%。

3. 临床经过　大致分为 3 个时期。

（1）急性感染期：HIV 感染后出现病毒血症，病毒大量复制（每日可产生 10^9～10^{10} HIV 颗粒），血中可分离到 HIV 或检出 P24 抗原和 HIV 核酸。经窗口期（平均 45 天）后血中可出现抗 HIV 抗体。此期 HIV 被机体大量清除，机体的免疫系统（尤其是 $CD4^+$ 淋巴细胞、单核-吞噬细胞）也受到严重破坏。

（2）无症状潜伏期：平均 8 年左右。此期内机体免疫系统与 HIV 的相互作用大体处于动态平衡。血液中难以分离到病毒，可检出抗 HIV 抗体，但体内仍有 HIV 在低浓度复制，机体免疫系统被逐步破坏。

（3）艾滋病期：机体免疫系统被严重破坏，$CD4^+$ T 淋巴细胞急剧减少，毒血症再次出现。发生各种机会感染（卡氏肺囊虫肺炎、隐孢子虫病等）和恶性肿瘤（如卡波济肉瘤）而死亡。

4. 实验室诊断　艾滋病的实验室检查必须严格按国家颁布的《艾滋病检

测工作管理办法》和《艾滋病检测技术规范》进行。实验室（筛查实验室和确认实验室）须经卫生行政部门审批合格后方可开展工作。相关技术人员须接受专门技术培训并获上岗证书。实验室须有专用设备，所用试剂均应经国家食品药品监督管理局注册批准，批检合格，经临床广泛验证有高度敏感性和特异性并在有效期内使用。筛查实验室通常只进行血清抗 HIV 抗体筛查，结果阳性时血清标本要送确认实验室进行免疫印迹实验确认。

［免疫学检验］

1. $CD4^+$ T 淋巴细胞计数　用荧光素标记的抗 CD4 单克隆抗体染色后用流式细胞仪进行检查，报告 $CD4^+$ T 淋巴细胞百分率和绝对数。对艾滋病诊断、疾病分期、预后判断有重要价值。与血浆病毒载量（viral load）配合是指导临床抗病毒治疗的可靠指标。

2. HIV 病毒载量检查　通常用血浆中 HIV RNA 的拷贝数表示。检测方法有逆转录 PCR（RT-PCR）；核酸序列扩增实验（nucleic acid sequence based amplification，NASBA）；分支 DNA 信号扩增（branched DNA signal amplification，bDNA）实验等。

3. HIV P24 抗原测定　P24 是 HIV-1 核衣壳的结构蛋白，对 HIV-1 有特异性。HIV 感染后早期（窗口期），抗 HIV 抗体出现前血中已可检出 P24 抗原。检查方法为双抗体夹心 ELISA 法。

4. 抗 HIV 抗体测定　抗 HIV 抗体阳性提示 HIV 感染，按《艾滋病检测技术规范》要求，艾滋病筛查实验室应通过抗 HIV 抗体的筛查进行艾滋病患者和 HIV 感染者的初步诊断。供血者和受血者，拟手术患者，需进行各种创伤性检查的患者，产妇分娩前，各种内镜检查前均应常规进行抗 HIV 抗体筛查。出现阳性时需用另一厂家或另一种原理的试剂复查并送实验室确认。常用的有以下几种。

（1）ELISA 间接法：用 HIV-1、HIV-2 的基因重组特异抗原或人工合成的多肽抗原包被反应板微孔，依次加入待测血清、酶标记抗人 IgG（抗人 IgM）、酶底物/色原后依据呈色反应强度判定待测血清中有无抗 HIV 抗体及其水平。这类试剂通常为第 2 代试剂，一般在 HIV 感染后 5～6 周可测出血中抗体。

（2）ELISA 双抗原夹心法：属于第 3 代试剂。包被抗原和酶标记抗原都由 HIV-1、HIV-2 和 HIV-1 的 O 亚型抗原（基因重组抗原加人工合成多肽抗原）组成，所测为包括 IgG 类、IgA 类、IgM 类抗 HIV 抗体在内的总抗 HIV 抗体，因此敏感性更高，可将窗口期缩短至 3 周左右。第四代试剂国内尚未常规使用，可同时检测 HIV-1/2 型和 HIV-1 的 O 亚型抗体和 P24 抗原。反应板

微孔用 HIV-1/2/O 抗原和抗 P24 抗体包被，酶标志物也为相同的抗原、抗体。窗口期可缩短至 2 周。

(3) 乳胶颗粒凝集实验：是一种抗 HIV 抗体快速筛查法，适合检测少量标本。原理是包被 HIV 抗原的乳胶颗粒与待测血清中抗 HIV 抗体反应时出现肉眼可见的凝集。敏感性和特异性不及 ELISA 法，不推荐用于献血员的筛选。

(4) 金标记免疫层析实验：将 HIV 抗原包被在硝酸纤维素（NC）膜上的测试区，待血清（含抗 HIV 抗体）与膜条端部接触时，可与其内的胶体金标记的抗人 IgG（或金黄色葡萄球菌 A 蛋白）结合，通过 NC 膜的毛细管效应，结合物层析至测试区与固相化的 HIV 抗原结合，出现呈色条带即表明待测血清中抗 HIV 抗体阳性。此法也为快速筛查法，适于单个标本的应急使用，较为方便。

(5) 免疫印迹实验：即 Western Blot（WB），是一种确认实验，由艾滋病确认实验室对筛查实验室送来的抗 HIV 抗体可疑阳性的血清标本用此法予以确认。先将 HIV 抗原进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），将各种蛋白质抗原依相对分子质量大小不同分离开来，转印至 NC 膜上。将膜条浸入稀释的待检血清中，血清中抗 HIV 抗体即可与膜上 HIV 抗原结合，洗后 NC 膜再浸入酶标记抗人 IgG 中反应，洗后 NC 膜再浸入酶底物/色原溶液中，抗 HIV 抗体与相应抗原结合处即可显现呈色条带。我国规定如果出现 2 条 env 基因编码的包膜蛋白条带（gp41，gp160/gp120），或出现 1 条 env 带和 1 条 P24 带即可确认抗 HIV-1 抗体阳性。

[参考值]

健康人抗 HIV 抗体、P24 抗原均为阴性。

[结果分析与临床意义]

1. $CD4^+$T 细胞与 HIV 病毒载量　HIV 感染者每日可复制产生 100 亿个病毒颗粒，因此必须进行抗病毒治疗。1996 年 7 月第 11 届国际 AIDS 大会上报告的高效联合抗逆转录病毒疗法（HAART）显著地延长了患者生命。美国卫生与公共服务部（DHHS）在 2005 年 10 月公布的艾滋病治疗指南中规定：无症状感染期，$CD4^+$T 淋巴细胞数<200 个/μl，无论血浆病毒载量任何值均应进行治疗；$CD4^+$T 细胞>350 个/μl，使病毒载量≥100 000/ml，仍建议推迟治疗。我国 2005 年 1 月发布的《艾滋病诊疗指南》鉴于血浆病毒载量在我国还不能普遍开展，对无症状感染期患者主要根据 $CD4^+$T 细胞数确定治疗时机。例如，$CD4^+$T 细胞数>350 个/μl 时建议定期复查，暂不治疗；200～350 个/μl 时，则应根据 $CD4^+$T 细胞变化情况、病毒载量以及患者的具体情况综合考虑。

2. P24 抗原测定　此法可在抗 HIV 抗体出现前 1～2 周检出 HIV-1 的核心抗原（P24），故可缩短窗口期。抗 HIV 抗体阳性母亲所生婴儿，由于 IgG 类抗体可通过胎盘进入婴儿体内，故在 18 个月内婴儿测出抗 HIV 抗体并不能判定婴儿 HIV 感染，但婴儿血中如测出 P24 抗原则表明其已被感染。血清 P24 抗原测定阳性时，尚需用中和实验确认。P24 抗原在 HIV 感染者血中含量很低（0～500pg/ml），加以与相应抗体结合形成免疫复合物后会影响检测，故阴性结果不能排除 HIV 感染。

3. 抗 HIV 抗体测定　由于 HIV 侵入人体后可在静息的记忆 $CD4^+$ T 淋巴细胞中呈潜伏状态持续存在，而此类细胞的平均半衰期长达 43.9 个月，体内即使只有 10^5 个此类荷毒细胞，要想根除也需要 60 年之久。目前认为，即使接受有效的 HAART 治疗，患者体内也会终生带毒。因此抗 HIV 抗体阳性不仅意味着已感染了 HIV，而且还具有传染性。通常抗 HIV 抗体阳性的无症状感染者，5 年之内将有 10%～30%的人进展成为艾滋病患者。

第六节　严重急性呼吸综合征（SARS）

严重急性呼吸综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS）是由一种新型冠状病毒（SARS-CoV）引起的急性下呼吸道传染病。2002 年 11 月 16 日在我国发现首例患者，最初称为“传染性非典型肺炎”。由于病因不明，处置缺乏针对性，迅速传播，至 2003 年 8 月 7 日，全球有 32 个国家和地区的 8 422人罹患，病死 916 人，病死率 10.9%，65 岁以上高龄患者病死率＞50%。2003 年 2 月 28 日，WHO 正式命名本病为严重急性呼吸综合征，并于同年 4 月 16 日宣布本病病原为新型冠状病毒。

［概述］

1. SARS 冠状病毒　SARS-CoV 属于冠状病毒科（Coronaviridae）、冠状病毒属（*Coronavirus*）。根据病毒核衣壳蛋白的同源性该属病毒原分为三组：Ⅰ组中包括人冠状病毒（H CoV）229E 株，猪流行性腹泻病毒，犬冠状病毒等；Ⅱ组中包括 H CoV 的 OC43 株、牛冠状病毒、小鼠肝炎病毒等；Ⅲ组中包括火鸡冠状病毒、禽传染性支气管炎病毒。人冠状病毒 229E 和 OC43 株主要引起普通感冒（占总感冒患者的 10%～30%），极少引起肺炎。SARS-CoV 与已知人冠状病毒基因序列同源性仅 50%～60%，氨基酸序列一致性仅 40%～50%，故将其列为冠状病毒属的第Ⅳ组。

SARS-CoV 病毒基因组为正股单链 RNA，序列全长 29 736（29 727～29 751）bp，不同毒株之间有小的差异。有 6 种主要蛋白质，即突起蛋白

(spike glycoprotein，S 蛋白)，小包膜蛋白（small envelope glycoprotein，E 蛋白)，膜蛋白（membrane glycoprotein，M 蛋白)，核衣壳磷蛋白（nucleocapsid phosphoprotein，N 蛋白）以及 RNA 水解酶和 3CL 蛋白水解酶。

2. 临床与传播途径　SARS-CoV 对人有高度传染性和致病性。SARS 患者主要症状为发热、干咳、头痛、全身酸痛、呼吸困难和低氧血症。少数患者进展为呼吸窘迫综合征。肺部影像学检查示肺炎改变。出现症状后 SARS-CoV 在患者血中至少可存活 10 天。在鼻咽部分泌物、痰、支气管肺泡灌洗液、尿、粪便中都有大量病毒存在。病毒经飞沫传染，通过呼吸道黏膜侵入体内。也可经污染病毒的手指接触眼、鼻黏膜感染。尿中或腹泻患者粪便中的 SARS-CoV 也可以通过不完善的污水处理系统以气溶胶形式传播。野生动物尤其是果子狸标本中已发现与人 SARS-CoV 基因序列完全同源的 SARS-CoV。

3. 实验室检查　SARS 患者典型的实验室检查结果为白细胞数减少或正常，淋巴细胞数减少，丙氨酸氨基转移酶（ALT）轻度升高。中性粒细胞数显著升高、淋巴细胞数显著减少、ALT/乳酸脱氢酶（LDH）活性显著升高者预后不良。SARS 的特异性实验室诊断法包括：

(1) SARS-CoV 分离：以患者痰液、鼻咽部分泌物、尿液、口咽部洗液、血液、支气管肺泡灌洗液以及尸检或活检脏器组织为标本，接种非洲绿猴肾细胞（Vero E6)，观察细胞病变效应（CPE)，或用直接荧光抗体实验、ELISA、聚合酶链反应（PCR）证实病毒的存在。

(2) 检查 SARS-CoV 核酸：WHO 已公布 7 对引物，用逆转录 PCR（RT-PCR)，实时荧光定量 RT-PCR、套式 PCR、增强的实时荧光定量 PCR 自上述标本中扩增 SARS-CoV 的 RNA 聚合酶基因片段。

(3) 检测抗 SARS-CoV 抗体：目前有试剂盒供应并经过临床验证的方法有间接 ELISA 法、双抗原夹心 ELISA 法和间接荧光抗体法。应当强调指出的是，根据 2002～2004 年 SARS 防治经验，SARS-CoV 传染性很强，从事 SARS 诊断的实验室，应有完善的安全防护设施，检验人员也必须经过相应的培训。一般医院检验科无条件开展 SARS-CoV 分离培养和核酸检查。

[免疫学检验]

一般医院检验科可开展的用于发热性急性下呼吸道炎症患者的筛查实验主要是检测抗 SARS-CoV 抗体。有以下方法。

1. ELISA 法　国内供应的试剂盒有两种：

(1) 双抗原夹心 ELISA 法：用基因重组的 SARS-CoV N 蛋白包被反应板微孔，待测血清中抗 SARS-CoV 抗体可与之结合，洗去未结合物，加入酶标记 N 蛋白，即可在固相上形成 N 蛋白-抗 SARS-CoV 抗体-酶标记 N 蛋白

复合物。加入酶底物/色原后发生呈色反应，呈色强度反映抗 SARS-CoV 抗体水平。此法所测为包括 IgG、IgA、IgM 类抗 SARS-CoV 抗体在内的总抗体。

（2）间接 ELISA 法：是用纯化的 SARS-CoV 全病毒裂解产物包被反应板微孔，待测血清中抗 SARS-CoV 抗体与之结合后再依次加入酶标记抗人 IgG（抗人 IgM）抗体和酶底物/色原，出现呈色反应。本法可分别检测 IgG 类或 IgM 类抗 SARS-CoV 抗体。

2. 间接免疫荧光法　用 SARS-CoV 感染的 Vero E6 细胞制成抗原片，滴加不同稀释度的待测血清，其中的抗 SARS-CoV 抗体可与感染细胞胞浆（质）内存在的 SARS-CoV 结合，洗片后用异硫氰酸荧光素（FITC）标记的抗人 IgG（抗人 IgM）抗体染色，于荧光显微镜下观察，可见胞内出现典型的黄绿色荧光。本法可检测 IgG 或 IgM 类抗 SARS-CoV 抗体。

［参考值］

由于检测抗 SARS-CoV 抗体的试剂盒均未标准化，敏感性和特异性未经严格评估，有关数据多来自 ring-trial（圈内实验，检测对象限于患者与接触者），因此尚无可用的参考值。各实验室最好用常规检测用的试剂盒对本地区不同人群进行调查，建立本实验室的参考值。抗 SARS-CoV 抗体以效价报告。恢复期（病后 3～4 周）血清最好与急性期（病后 1 周内）血清在同一实验条件下检测，急性期血清抗 SARS-CoV 抗体阴性，恢复期血清抗体阳性，或恢复期血清较急性期血清抗体效价有≥4 倍升高最有诊断价值。据有关资料介绍，健康人群（包括医务人员、献血员和一般体检者）血清抗 SARS-CoV 抗体均为阴性，但一些与野生动物（果子狸、蛇等）接触者（销售人员、厨师），血清中可检出抗 SARS-CoV 抗体。

［结果分析与临床意义］

IgM 类抗 SARS-CoV 抗体最早出现于病后的 5～6 天，IgG 类抗体在病后 10 天才开始出现。病后 2～4 周 IgG 类和 IgM 类抗体的滴度和阳性率才逐步升高，IgG 类抗体的阳性率从发病初期至恢复期均显著高于 IgM 类抗体。因此，检测抗 SARS-CoV 抗体达不到早期诊断 SARS 的目的，但阴性结果也不应轻易排除 SARS。

抗 SARS-CoV 抗体阳性可作为 SARS 诊断的重要依据。一般医院检验科在发出阳性报告之前应将血清标本送权威实验室进一步确认。临床医生也应结合患者临床情况和流行病学的相关资料对抗 SARS-CoV 抗体的检查结果进行综合分析判断。

第七节 人禽流感

禽流感（avian influenza）是由甲型（A型）流感病毒中某些亚型引起的禽类急性呼吸道传染病。1878年在意大利的流行被首次记载，此后世界各地都有流行并导致成百万、成千万家禽死亡或被宰杀。禽流感病毒中H5亚型所致禽类疾病传播快，危害大，病情凶险，除急性呼吸道炎症外常伴有全身出血性病变，心、肺、肾等多脏器衰竭，称为高致病性禽流感（highly pathogenic avian influenza）。1997年香港暴发流行H5N1型引起的禽流感，除大批家禽死亡外，首次报告了人类感染病例：确诊18例，其中6例死亡。2003年2月荷兰发生H7N7亚型引起的禽流感，1名兽医死亡，83人患上结膜炎。自2003年12月至2006年5月初，世界卫生组织（WHO）共确诊H5N1亚型所致人禽流感207例，死亡115例，死亡率55.6%。死亡人数/确诊人数依序为越南42/93，印度尼西亚26/34，泰国14/22，中国12/18，土耳其4/12，埃及4/12，阿塞拜疆5/8，柬埔寨6/6，伊拉克2/2。鉴于人类对大多数H和N亚型禽流感病毒没有免疫力，禽流感病毒具有启动人类新的流感大流行的潜在威胁，2005年10月24日全球30个国家的卫生部长和9个国际组织的代表在加拿大渥太华召开了“全球流感大流行准备——卫生部长级国际会议”，共商应对H5N1亚型禽流感病毒引发人类流感大流行的策略。我国卫生部已颁布《人禽流感诊疗方案》（2005年版修订版）和《禽流感实验室检测技术方案》，在人禽流感诊治工作中应严格遵循。

［概述］

1. 禽流感病毒　属于正黏病毒科（*Orthomyxoviridae*）、流感病毒属中的甲型流感病毒。是一种多形态、有囊膜的RNA病毒。通常为球形，直径80～120nm。有些毒株初分离时呈丝状体。病毒颗粒有三层，外层为双层类脂囊膜，表面有血凝素（H）：能与细胞上受体结合，在病毒穿膜过程中起关键作用；神经氨酸酶（N）：能水解细胞表面受体中的N-乙酰基神经氨酸，有利于病毒粒子的成熟和释放；基质蛋白M2：参与血凝素合成、病毒脱壳和装配。中间层是基质蛋白M1形成的球形蛋白壳，维持病毒粒子的形态，调节病毒转录酶活性，参与子代病毒粒子的装配。里层为核壳体，含核蛋白（NP）、聚合酶和单链RNA。1980年WHO根据流感病毒血凝素（H）、神经氨酸酶（N）的不同，将甲型流感病毒（包括禽流感病毒）分成若干亚型，H有16个亚型（H1～H16），N有9个亚型（N1～N9）。规定一株流感病毒的命名应包括型别/宿主/分离地点/毒株序号/分离时间（亚型）。如：A/鸡/香港/258/97

(H5N1)。现已证实感染人的禽流感病毒亚型有 H5N1、H9N2、H7N7、H7N2、H7N3 等。禽流感病毒对热敏感，紫外线照射、常用消毒药均可迅速使其灭活。

2. 禽流感的传染源主要是患病的家禽、野禽，尚无人传染给人的确切证据。经呼吸道传播，也可经密切接触病禽的分泌物、排泄物而感染。儿童易感。从事家禽饲养、销售、宰杀者，与人禽流感患者密切接触者及相关实验室工作者为易感人群。

3. 人禽流感的潜伏期通常为 2～4 天。临床表现依感染的亚型不同而异。H5N1 感染者最重，急性发病，发热≥39℃，流涕、鼻塞、咳嗽、咽痛、全身酸痛、软弱无力，有的患者有腹痛、腹泻。病情发展快速，高热不退，发生肺炎，可进展为急性呼吸窘迫综合征、肺出血、多脏器功能衰竭乃至死亡。H7N7 感染后主要表现为结膜炎。H9N2 感染者（1998～1999 年广东、香港发生数例）仅有轻微上呼吸道感染症状。最近研究发现，H5N1 感染后，支气管和肺泡上皮细胞、活化的吞噬细胞可迅速产生高浓度的趋化因子（γ 干扰素诱导蛋白 10、IP-10）和促炎性的细胞因子。免疫系统的这种过度反应（所谓免疫风暴）可能是导致肺部严重炎症损伤的直接原因。

4. 人禽流感患者白细胞总数不高或降低，淋巴细胞和血小板数减少。实验室诊断主要依据病毒分离、基因诊断和血清学实验。

（1）病毒分离：以患者鼻咽分泌物、口腔含漱液、气管吸出物或支气管灌洗液为标本，接种鸡胚羊膜腔和尿囊腔。也可接种鸡胚成纤维细胞或 MDCK（Madin-Darby 犬肾）细胞，观察细胞病变效应（CPE）和用荧光素（FITC）标记特异抗体染色观察。耗时较长，需在生物安全三级实验室内进行。

（2）基因诊断：用逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）、实时荧光定量 PCR 等检测禽流感病毒亚型特异性 H 抗原基因，是一种可供选择的早期筛查方法。

（3）抗原测定：取患者呼吸道标本离心，沉淀物（脱落细胞）涂片、冷丙酮固定后用 FITC 标记的抗流感病毒型特异抗体染色检查，也可用 ELISA 法测定甲型流感病毒核蛋白（NP）或基质蛋白 M1 抗原、禽流感病毒 H 亚型抗原。

（4）血清学实验：采集患者急性期和发病 2～3 周后恢复期血清，在相同实验条件下于同批实验中测定。如血清中有抗禽流感病毒亚型毒株的抗体且恢复期血清抗体效价升高≥4 倍，可确诊禽流感病毒感染。常用方法为血凝抑制实验和微量中和实验。

［免疫学检验］

1. 呼吸道脱落细胞中禽流感病毒抗原测定　将患者鼻咽部分泌物、口腔

含漱液、支气管灌洗液等标本离心沉淀，取沉淀的细胞在载玻片上涂制成薄层细胞膜，冷丙酮固定后用 FITC 标记的抗甲型流感病毒特异抗体染色。洗去未反应物后用荧光显微镜检查。阳性时患者呼吸道脱落细胞胞质中可出现典型的颗粒状黄绿色荧光。此实验可用于快速诊断。也可用抗甲型流感病毒 M1 或抗 NP 抗体、抗禽流感病毒 H 亚型抗体建立双抗体夹心 ELISA 法，检测上述标本中有无相应病毒抗原。

2. 间接免疫荧光实验测定抗禽流感病毒抗体　用感染了 H5N1 禽流感病毒的细胞制成抗原片，固定后滴加患者不同稀释倍数的急性期和恢复期血清，反应后洗片，再滴加 FITC 标记的抗人 IgG（或抗人 IgM）抗体，洗片后用荧光显微镜检查。如果患者血清中有抗 H5N1 特异抗体，细胞胞质中可出现黄绿色的颗粒状荧光。出现阳性结果的待测血清最高稀释倍数的倒数为其效价。恢复期血清滴度较急性期血清效价升高≥4 倍有诊断价值。

3. 血凝抑制实验测定抗禽流感病毒抗体　禽流感病毒囊膜表面的血凝素能使多种动物红细胞发生凝集。用标准毒株感染鸡胚或敏感细胞，制成病毒悬液，在规定的条件下与红细胞反应，红细胞可出现肉眼可见的凝集。将病毒悬液预先与患者急性期、恢复期血清作用，如血清中有抗禽流感病毒抗体，可与病毒颗粒上血凝素结合，阻断其与红细胞的结合，红细胞不再出现凝集。出现血凝抑制的待测血清最高稀释倍数的倒数为其效价。恢复期血清效价较急性期血清效价升高≥4 倍有诊断意义。

4. 微量中和实验　禽流感病毒感染鸡胚后可使鸡胚死亡，感染敏感细胞后可引起细胞病变效应（CPE）。病毒悬液预先用患者待测血清中和，如血清中有抗禽流感病毒中和抗体，可阻断病毒的致死作用或致 CPE 作用。

［参考值］

正常人抗禽流感病毒抗体阴性；鼻咽部脱落细胞检查禽流感病毒抗原也为阴性。

［结果分析与临床意义］

1. 禽流感病毒尤其高致病性禽流感病毒，传染性强，病死率高，其诊断主要依据流行病学接触史、临床表现和实验室检查。诊断标准如下：

（1）医学观察病例：有流行病学接触史和流感样临床表现。

（2）疑似病例：有流行病学接触史和流感样症状，呼吸道分泌物或相关组织标本检出甲型流感病毒 M1 或 NP 抗原或编码它们的核酸。

（3）确诊病例：有流行病学接触史和流感样临床表现，从呼吸道分泌物或相关组织标本中分离出禽流感病毒；或检出禽流感病毒亚型特异性抗原或编码亚型特异性 H 抗原的核酸；或恢复期血清中抗禽流感病毒亚型毒株抗体的滴

度较急性期血清有≥4 倍升高。

2. 人禽流感的实验室诊断必须做到准确可靠和安全。

（1）采集合适的标本：鼻咽分泌物等标本应在病后 3～4 天内采集；急性期血清在发病 1 周内、恢复期血清在病后 2～3 周采集，双份血清在相同的实验条件下在同批实验中测定。

（2）所用检测试剂均须经国家主管部门审核认可。从事禽流感相关的实验室工作人员应经过专业技术培训。

（3）一般医院检验科不应随意发出禽流感实验室检查结果阳性的报告，应严格按照卫生主管部门制定的初筛实验室-复核实验室报告流程，并结合流行病学及临床资料综合分析后进行。

（4）要加强生物安全防护。病毒分离、微量中和实验等须在生物安全三级实验室进行；其他实验须在生物安全二级实验室进行。

3. 各种实验室检查方法的结果不应绝对化。

（1）病毒分离：阳性结果是诊断的金标准，但阴性结果不能排除禽流感诊断。对分离的病毒须进行型与亚型的鉴定。耗时长，1 周以上。只能在少数专业实验室中进行。

（2）核酸测定：可在 4 小时内完成，是初筛实验室早期筛查方法，但实验条件要求高，技术较复杂，实验室须经考核认可。所获得的只是一个基因片段的信息，阴性结果不能排除禽流感。

（3）病毒抗原测定：直接荧光抗体检查阳性时需排除其他甲型流感病毒感染；ELISA 法只有用抗禽流感病毒 H 亚型抗原的抗体建立的双抗体夹心法测出相应抗原，才有确诊价值。

（4）抗禽流感病毒抗体测定：这些实验都须急性期和恢复期血清在同一实验条件下同时测定，因此达不到早期诊断目的。血凝抑制实验敏感性低，与其他流感病毒有交叉反应。微量中和实验敏感性、特异性都高，但须由专业实验室进行，需时 10 天以上。以禽流感病毒亚型特异抗原包被反应板，建立间接 ELISA 法，测定特异性抗体，有较高的敏感性和特异性，目前需提供经广泛验证和权威部门批准的商品试剂盒。

第八节 肾综合征出血热

本病是由汉坦病毒（Hantavirus）引起的一种自然疫源性疾病，1931～1932 年在中苏边界黑龙江沿岸地区即被发现，以往曾称为流行性出血热（epidemic hemorrhagic fever，EHF）。1982 年世界卫生组织（WHO）正式定名为

肾综合征出血热（hemorrhagic fever with renal syndrome，HFRS）。本病流行较广，主要分布于欧亚两大洲。我国是 HFRS 发病大国，几乎遍及全国各省、区，目前疫区仍在扩大，并向某些中心城市扩延。本病病原由韩国李镐汪于 1976 年从疫区黑线姬鼠肺上皮细胞内发现。随着对病原学、流行病学的深入研究以及对临床发病规律、治疗及预防有效措施的掌握，我国 HFRS 发病人数已从 20 世纪 80 年代每年 3 万～11.5 万例降至 90 年代以来每年 3 万～6 万例；平均病死率从 20 世纪 60 年代 10.5%降至 70 年代的 8.7%、80 年代的 3.3%、90 年代以来的 1.0%左右。值得注意的是，1993 年美国西南部地区突发了一种类似急性呼吸窘迫综合征（ARDS）的急性传染病，临床上以双侧肺弥漫性浸润、间质水肿、呼吸窘迫、衰竭、心功能不全、病死率高为特征。从患者肺组织中分离得一种新型汉坦病毒（辛诺柏病毒，Sin Nombre virus，SNV），故将该病称为汉坦病毒肺综合征（Hantavirus pulmonary syndrome，HPS）或汉坦病毒心肺综合征（Hantavius cardiopulmonary syndrome，HCPS）。我国目前尚未发现类似病例。

［概述］

1. 病原与传播　HFRS 的病原属于布尼亚病毒科（Bunyaviridae）、汉坦病毒属（*Hantavirus*，HV）。该属病毒有 30 多个血清型/基因型，其中的主要型别汉滩病毒（Hantaan virus）、首尔病毒（Seoul virus）、普马拉病毒（Puumala virus）、泰国病毒（Thailand virus）、多布拉伐-贝尔格莱德病毒（Dobrava-Belgrade virus）现已明确为 HFRS 病原。在我国 HFRS 的流行主要由汉滩病毒和首尔病毒引起。

本病毒为球形或卵圆形，直径平均 122nm，外为双层脂质包膜，膜上有许多由糖蛋白 1、2（G_1、G_2）构成的包膜壳粒，呈长约 6nm 的穗状突起。为单股负链 RNA 病毒，基因组由大（L）、中（M）、小（S）三个片段组成。L 片段编码 RNA 聚合酶（L 蛋白）；M 片段编码包膜糖蛋白 G_1、G_2；S 片段编码病毒核衣壳蛋白（NP）。NP 具有强免疫原性，HFRS 患者体内抗 NP 抗体出现早，效价高，持续时间长。目前研制的大多数单克隆抗体也是 NP 特异的。

本病毒具有多宿主性，有约 200 种动物可被感染。对 HFRS 有重要流行病学意义的宿主动物和传染源主要为啮齿类动物。在我国黑线姬鼠、褐家鼠、小家鼠、黄胸鼠、黄毛鼠、社鼠、臭鼩鼱等最为重要。林区的大林姬鼠、实验室用大白鼠在特定条件下也可成为主要传染源。HFRS 传播途径很多，主要传播形式有三种：

（1）动物源性传播：吸入含有宿主动物带毒排泄物的气溶胶；食入宿主动

物带毒排泄物、分泌物污染的食物；伤口与宿主动物带毒排泄物、分泌物接触。

（2）螨媒传播：带毒的革螨、恙螨叮咬。

（3）垂直传播：患病孕妇通过胎盘传给胎儿。

2. 临床表现　本病患者全身多脏器、多系统受侵害，表现为全身小血管和毛细血管广泛损伤，血管内皮细胞肿胀、变性、坏死；全身皮肤、黏膜、组织器官广泛出血；各器官和体腔不同程度的水肿和积液；毛细血管内有微血栓形成；组织器官中有炎性细胞（浆细胞、单核细胞）浸润和灶性坏死。因此，临床表现错综复杂，病情凶险。典型病例均具有发热、出血和肾功能损伤三大主征，大致经过发热期、低血压期、少尿期、多尿期和恢复期五个时期。临床诊断必须结合流行病学资料，依据典型临床表现和实验室检查。

3. 实验室检查　患者发病早期白细胞总数正常或偏低，3～4 病日后可显著升高，杆状核细胞和异型淋巴细胞显著增多，血小板显著减少。尿中出现蛋白质、红细胞、白细胞、管型及膜状物；血尿素氮、肌酐升高。病原学检查可自患者血液、白细胞、尿沉渣细胞中检查病毒核酸（RT-PCR 法），或用荧光素标记的单克隆抗体检查外周血白细胞、尿沉渣细胞中的病毒抗原。有条件的实验室还可采集患者发病 5 日内的血液或白细胞接种敏感细胞如 Vero E6（非洲绿猴肾）细胞，A459（人肺癌）细胞，2BS（人胚肺二倍体）细胞等进行病毒分离。由于对实验室条件要求较高，生物安全防护要求严格，病原学检查目前未推荐用于常规实验室检查。在有商品试剂盒提供的情况下，常规开展测定血清中特异性抗体的血清学实验，有助于本病的诊断与鉴别。

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光实验　将 HFRS 病毒感染的细胞（如 Vero E6 细胞）制成细胞涂膜片，固定后滴加稀释的待测血清，温育，洗涤除去未反应血清成分，再滴加荧光素标记的抗人 IgM（或抗人 IgG）抗体，温育、洗涤，膜片上形成 HFRS 病毒抗原-特异抗体（人 IgM 或 IgG）-荧光素标记的抗人 Ig 抗体复合物，用荧光显微镜检查时，胞浆中可出现特异性点状或块状荧光。根据所用荧光素标记抗体的不同，可分别测定 IgM 类或 IgG 类抗体。以出现阳性结果的待测血清最高稀释倍数的倒数为抗体滴度。通常需同时测定急性期和恢复期血清。

2. 间接 ELISA 实验　先用纯化的抗 HFRS 病毒特异抗体包被聚苯乙烯反应板微孔，用其将 HFRS 病毒抗原牢固地吸附于固相上，再加入稀释的待测血清，血清中抗 HFRS 抗体与固相抗原结合。利用金黄色葡萄球菌 A 蛋白

(SPA) 能与人 IgG Fc 段结合的特性，加入酶标记 SPA，经温育、洗涤后，固相上形成纯化抗 HFRS 病毒抗体-HFRS 病毒抗原-待测抗 HFRS 病毒抗体（人 IgG）-酶标记 SPA。加入酶底物/色原溶液，产生呈色反应，呈色强度与待测血清中抗 HFRS 抗体水平呈正比。本法因所测为 IgG 类抗体，也需同时测定急性期和恢复期双份血清。

3. 抗 μ 链抗体捕获 ELISA 实验　本法设计用来测定 IgM 类抗 HFRS 病毒抗体。先将抗人 μ 链抗体包被于聚苯乙烯反应板微孔，加入稀释的待测血清，血清中 IgM 类抗体被固相上抗 μ 链抗体捕获，洗涤后加入 HFRS 病毒抗原，温育并洗涤后再加入酶标记抗 HFRS 病毒单克隆抗体，温育后固相上形成抗 μ 链-IgM 类抗 HFRS 病毒抗体-HFRS 病毒抗原-酶标记抗 HFRS 病毒单克隆抗体复合物。加入酶底物/色原溶液，产生呈色反应，根据呈色强度判定待测血清中 IgM 类抗 HFRS 抗体水平。

[参考值]

健康人抗 HFRS 病毒抗体为阴性。由于目前的检测方法均由各专业实验室建立，判定阳性的标准各不相同，亟需由试剂厂家提供商品试剂盒，并在此基础上对人群进行抗体水平的调查，建立相应的参考值。

[结果分析与临床意义]

肾综合征出血热为自然疫源性疾病，依据其流行病学资料、典型的临床经过和一般实验室检查，临床诊断并不困难。

IgM 类抗 HFRS 病毒抗体在患病后早期可出现阳性，IgG 类抗体滴度恢复期血清较急性期血清有≥4 倍升高，均有助于本病的确诊。

第九节　围生期相关感染

有一组病原体与围生期感染密切相关，包括弓形虫（*Toxoplasma gondii*）、风疹病毒（rubivirus）、巨细胞病毒（cytomegalovirus）、单纯疱疹病毒（herpesvirus）和沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）。日本学者片山诚曾将前 4 种病原合称 ToRCH（torch，火炬）以期引起围产医学与优生优育专家的关注。本节将沙眼衣原体与 ToRCH 一并介绍。应当指出的是，这些病原体除与围生期感染相关外，在免疫缺陷患者或使用免疫抑制剂的患者（如艾滋病患者，器官移植术后），这些病原体也常引起严重的机会性感染。

[概述]

1. 弓形虫病（toxoplasmosis）　是由刚地弓形虫（*T. gondii*）引起的一种人兽共患自然疫源性疾病，全球分布，各国居民抗体阳性率 18%～86%，我

国对16个省、市、自治区81 968名居民调查，抗体阳性率平均5.17%。猪、牛、羊、马、猫、狗、鸡等温血动物普遍易感。我国调查猪的感染率最高，长期排出包囊，危害很大。猫科动物是终宿主和中间宿主，是重要的传染源。人是弓形虫的中间宿主，动物饲养人员、肉类加工人员、宠物（猫）饲养者感染率较高。当人经消化道食入污染弓形虫包囊、假包囊、卵囊的食物时，释出的速殖子迅速经淋巴和血流进入心、肝、脑、肾、眼等器官和组织，寄生于细胞浆内和核内。孕妇感染弓形虫后可通过胎盘传给胎儿，导致流产、早产或胎儿畸形。弓形虫感染多呈隐性过程，临床常无特征性表现，症状、体征依弓形虫侵犯部位的不同而异，确诊常需实验室检查。

2. 风疹（rubella） 是由风疹病毒引起的一种急性呼吸道传染病。患者是唯一传染源，包括亚临床型及隐性感染者。发病前5～7天至发病后3～5天为传染期，发病当日和前一日传染性最强。主要由带病毒飞沫经呼吸道传播，密切接触也可传染。妊娠早期（头3个月）感染后，可引起流产、死亡、早产或引起胎儿的先天性风疹综合征。胎内感染的新生儿，因无力清除体内病毒，其咽部可排病毒数周至数月，因此，通过污染的奶瓶、奶头、衣被、尿布等可引起婴儿室风疹流行。获得性风疹的易感人群为1～5岁儿童和孕产妇。潜伏期2～3周。临床表现为低热，发热1～2天后出现皮疹，耳后、枕部淋巴结肿大。先天性风疹综合征胎儿出生时低体重，常有先天性心脏病、新生儿肝炎、白内障、智障、脑炎等各种缺陷或畸形。临床诊断主要依据典型症状，必要时可测定抗风疹病毒抗体确诊。

3. 巨细胞病毒感染 巨细胞病毒（CMV）属疱疹病毒属，可引起人的先天性或后天性感染。患者和隐性感染者可长期或间歇性地自唾液、尿液或宫颈分泌物排出病毒，成为本病传染源。孕妇（妊娠后前6个月）感染CMV后可通过胎盘感染胎儿。后天感染主要通过密切接触带毒的尿液、唾液、精液、宫颈与阴道分泌物、乳汁、粪便等发生。本病遍布全球，成人抗体阳性率80%～100%。特征性病变是受染细胞体积增大3～4倍（直径25～40μm），先在胞浆内出现包涵体，嗜碱性（染成深蓝色），直径2～4μm，继而在胞核中央出现直径10～15μm的嗜酸性包涵体，染成红色。此种受染细胞可见于各组织器官。临床表现依受侵犯脏器的不同而异，常无特征性的症状与体征。实验室检查在各种体液的细胞中找到含有包涵体的巨细胞有诊断价值，免疫学检验测定CMV抗原或抗CMV抗体也有辅助诊断价值。

4. 疱疹病毒感染 疱疹病毒（HSV）为疱疹病毒属成员，有1型（HSV-1）和2型（HSV-2）两型。HSV-1型主要引起皮肤、黏膜感染，从婴幼儿开始感染率逐渐增高，成年人感染者可达70%～80%；HSV-2型主要引起生殖器和

肛门部位感染，感染率从青春期开始升高，成年人可达15%～50%。HSV存在于感染者唾液、分泌物中，主要通过直接密切接触以及性接触而传染。原发性感染临床表现为疱疹性牙龈炎、疱疹性湿疹、疱疹性角膜结膜炎以及单纯疱疹病毒性脑炎、肝炎等。复发性感染主要表现有复发性单纯疱疹和复发性生殖器疱疹等。患生殖道疱疹的孕妇，分娩时可将HSV传给新生儿，引起新生儿疱疹。有人认为HSV可通过胎盘感染胎儿，导致胎儿畸形或流产，也有人认为这种情况十分罕见。HSV感染的病理改变为表皮内单房性水疱，可见气球状表皮细胞和嗜酸性核内包涵体。本病根据在皮肤黏膜交界处反复发生成簇水疱，诊断不难。生殖器疱疹不易确诊时，可在新鲜疱底刮片，Giemsa染色后找气球状细胞和核内嗜酸性包涵体确诊。IgM类抗HSV抗体测定有辅助诊断价值。

5. 沙眼衣原体感染　沙眼衣原体属于衣原体属。相关内容可参看本章第十七节肺炎衣原体感染。用国际公认的微量免疫荧光实验，可将沙眼衣原体分成18个血清型，其中沙眼生物变种14个（A～K，Ba、Da和Ia），D～K血清型引起泌尿生殖系统感染和婴儿感染，A、B、Ba和C血清型是人类沙眼病原体；性病淋巴肉芽肿（LGV）生物变种4个（L1、L2、L2a和L3），是LGV病原体。本病通过直接接触、间接接触病原体污染物或性接触传染。受染的孕妇分娩时可经产道感染新生儿，引起眼结合膜炎或肺炎。依感染的方式和沙眼衣原体血清型的不同，临床表现有沙眼，包涵体结膜炎，非淋菌性泌尿生殖道炎及性病淋巴肉芽肿（男性腹股沟淋巴结、女性直肠周围淋巴结肿大、疼痛、破溃流脓）。临床诊断一般不困难，非淋菌性泌尿生殖道炎症患者可检测抗沙眼衣原体抗体协助诊断。

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光实验　用弓形虫速殖子，风疹病毒、CMV、HSV和沙眼衣原体感染的细胞分别制成抗原膜片，滴加稀释的待测血清，温育并洗涤，再滴加异硫氰酸荧光素标记的抗人IgM（或抗人IgG、抗人IgA）抗体，温育后洗涤。待测血清中如含有相应的特异抗体，抗原片上即可形成各病原体抗原-特异抗体-荧光抗体复合物。在用荧光显微镜检查时，弓形虫或其他病原感染细胞的胞浆或胞核，可呈现特异的亮绿色荧光。以出现阳性结果的血清最高稀释倍数的倒数为抗体效价。

2. ELISA实验　用弓形虫Deelen株的全抗原，感染风疹病毒HPV-77株的Vero细胞裂解物，感染CMV AD169株的MRC-5细胞裂解物，HSV-1型Mac Intyre株、HSV-2型MS株的抗原，自感染沙眼衣原体血清型K的BGM细胞提取的天然主要的膜蛋白抗原分别包被聚苯乙烯反应板微孔，加入待测血

清，温育后洗涤，再加入酶标记抗人 IgM（或抗人 IgG、抗人 IgA）抗体，温育并洗涤。待测血清中如含有相应的特异抗体，固相上即可形成病原体特异抗原-特异抗体（人 IgM/IgA/IgG）-酶标记抗人 IgM/抗人 IgG/抗人 IgA 抗体复合物，在加入酶底物/色原溶液时出现呈色反应，呈色强度反映相关抗体的水平。本法定性实验以 P/N（待测血清吸光度/阴性对照血清吸光度）比值≥2.1 为阳性；定量实验以试剂公司提供的含不同任意单位（RU/ml）的抗体标准品制备标准曲线，抗体浓度为横坐标，各浓度相应的吸光度为纵坐标。待测血清中的抗体浓度可依所测吸光度从标准曲线得出。

3. 直接免疫荧光实验测定巨细胞病毒的 pp65 抗原　pp65 是 CMV 复制早期产生的被膜蛋白，CMV 活动性感染时患者外周血白细胞中出现 pp65。自患者抗凝血中分离出多形核白细胞，多聚甲聚固定后滴加抗 CMV pp65 单克隆抗体，温育、洗涤后滴加荧光素标记羊抗鼠 IgG 抗体，温育、洗涤后在荧光显微镜下观察，白细胞胞浆中出现典型荧光为阳性细胞，全片 pp65 阳性细胞≥5 个判为阳性。

［参考值］

1. 健康人上述各种病原体的 IgM 类抗体均为阴性；CMV pp65 抗原也为阴性。

2. 各实验室应通过使用专一的试剂盒，调查本地区人群中针对各病原的抗体水平，建立自己的参考值。

［结果分析与临床意义］

1. 上述病原体所致感染中，很多为隐性感染，一般人群中抗体阳性率（尤其是 IgG 类抗体）很高。因此，只有 IgM 类抗体阳性，尤其是连续检查，抗体水平逐渐升高者才有诊断意义。

2. 上述病原体均涉及围生期感染，但目前相关人士对围生期妇女是否要进行这些病原感染的常规筛查还存在争议。

3. 即使针对这些病原体的 IgM 类抗体阳性，也不能仅以此作为终止妊娠的唯一依据，必须结合临床和其他检查，综合分析后再做决定。

第十节　军团菌病

1976 年 7 月，美国退伍军人协会在费城召开大会时发生肺炎的暴发流行，200 余人患病，34 人死亡，病因不明。其后进行了医学史上空前规模的流行病学调查，证实该病病原菌为一种新的细菌，命名为军团菌，所致疾病称为军团菌病（Legionnaires disease）。

［概述］

1. 军团菌列于军团菌科（Legionellaceae），军团菌属（*Legionella*），目前包括嗜肺军团菌（*L. pneumophila*）在内有 45 个种，其中约一半对人致病，共有 60 多个血清型（serogroups）。引起 1976 年费城军团菌病爆发流行的为嗜肺军团菌 1 型。绝大多数军团菌病由嗜肺军团菌 1、4、6 型引起。除 *L. pneumophila* 外，最常引起疾病的还有米克达德军团菌（*L. micdadei*），长滩军团菌（*L. longbeachae*），杜莫菲军团菌（*L. dumoffii*）和博兹曼军团菌（*L. bozemanii*）等。本菌为短小（长 2μm、宽 0.3～0.9μm）革兰染色阴性杆菌。培养时对营养有特殊要求（需半胱氨酸、铁盐等）。

2. 军团菌引起的疾病有两种类型。轻型的称 Pontiac 热，潜伏期 24～48 小时，急性发作，流感样症状，无肺炎，是一种自限性疾病，不用抗生素治疗，1 周内可完全恢复。已证实本病可由嗜肺军团菌 1、6、7 型、米克达德军团菌、费里军团菌（*L. feeleii*）、阿尼莎军团菌（*L. anisa*）等引起。诊断依靠自血清中测出特异抗体。肺炎型是以肺部感染为主的全身多脏器损害。在欧美国家需住院治疗的散发性社区获得性肺炎（community acquired pneumonias，CAP）病人中，有 2%～15%由本菌引起，易感人群为儿童和免疫功能受到损害的人，故常见于重症住院患者，尤其是入住重症监护病房（ICU）者。我国嗜肺军团菌感染者在 CAP 患者中占 5.1%，在门诊肺炎患者中<1%，而 ICU 患者中占 25%。未获有效治疗时病死率可达 45%。

3. 医院内感染所致的军团菌病在美国较为普遍。在开展器官移植的医院，军团菌病发病率高达 42%。这与这些医院普遍开展军团菌病的实验室诊断以及医院供水系统受军团菌污染和易感人群存在有关。目前认为，军团菌病不经人与人之间直接传播。吸入由污染军团菌的水形成的气溶胶是主要传播途径。空调的冷凝塔、呼吸治疗仪、雾化器和漩涡混合器都可产生气溶胶。其他如鼻胃管、自来水的莲蓬头以及对污染本菌的水的反复抽吸（aspiration）均可引起传播。

4. 军团菌病（肺炎或 Pontiac 热）因临床表现不典型，故诊断必须依赖实验室检查。

（1）培养：临床标本包括痰、气管吸出物、支气管灌洗液、胸腔积液、血以及引流管流出物等。在所有实验诊断方法中本法最敏感，敏感性为 80%，特异性 100%。价廉，每份标本检测费用 9 美元。对军团菌的各个种（species）均可测定。获得的细菌可用于分型（serogroups）和药物敏感实验。不足之处是需时 3～4 天，痰标本有时难以获得。

（2）核酸测定：用普通聚合酶链反应（PCR）测定嗜肺性军团菌 macrophage infectivity potentiator（mip）基因的引物序列（primer sequences）和

16s、5s、rRNA 基因。2001 年建立的实时 PCR（real time PCR）除可测嗜肺性军团菌外，也可测其他种（species）临床相关的军团菌。PCR 用的标本为咽拭子、支气管灌洗液、血清和尿液等。

本法敏感性不比培养法高（64%～100%），特异性文献报告不一（88%～100%），测试价格每份标本约需 50 美元。优点是当天可出报告，但需专业素质高的工作人员和专用实验室。因得不到分离菌故无法做药敏实验。目前未推荐用于常规标本检测。

（3）军团菌抗原测定：目前，美国很多医院常规开展尿抗原测定。采用双抗体夹心 ELISA 法或金标记免疫层析法。ELISA 法可测大批量标本，2～3 小时可发出报告，敏感性 70%～80%，特异性 99%；金标记免疫层析法可用于床边快速检验，15 分钟左右可发出报告，敏感性 80%，特异性 97%～100%。将尿浓缩可提高尿抗原实验的敏感性，将尿煮沸可提高实验的特异性。尿抗原测定不受治疗影响，病后数周内可保持阳性。只适用于 *L. pneumophila* 血清型（serogroup）1 型感染的患者是其不足之处。我国尚未常规开展此实验。

（4）直接荧光抗体（DFA）检查：将痰等病理性标本涂片、固定后，用荧光素标记的抗军团菌抗体染色，在荧光显微镜下观察，找到发特异荧光的细菌即为阳性。本法未列入常规检验。敏感性不高（33%～70%）；特异性 96%～99%。抗军团菌单克隆抗体优于多克隆抗体，因其背景的非特异荧光染色较低。

（5）血清学实验：美国疾病控制中心（CDC）只推荐间接荧光抗体（IFA）实验用于感染 *L. pneumophila* 血清型 1 型患者的诊断。因为对嗜肺军团菌其他血清型和其他军团菌种感染的患者，尚缺乏充分的敏感性和特异性方面的资料。国内除 IFA 外，也采用微量凝集实验和 ELISA 法。血清学实验总的敏感性 40%～75%，特异性 96%～99%。本法主要用于流行病学调查，因为需要急性期和恢复期双份血清才能做出明确诊断，所以对军团菌病的早期诊断（immediate diagnosis）没有太大帮助。

［免疫学检验］

1. 间接荧光抗体（IFA）实验　将嗜肺军团菌 1～15 血清型的细菌单独或适当组合涂制成抗原片。将患者血清双倍连续稀释后滴片，如含有特异性抗体，即可与涂片上的军团菌结合，待加入荧光素标记的抗人 IgG（或抗人 IgM）抗体时，载玻片上即可形成军团菌-抗军团菌抗体-荧光抗体复合物。用荧光显微镜观察，出现发特异性荧光的细菌即为阳性，出现阳性结果的血清最高稀释倍数的倒数即为抗体效价。

2. 微量凝集实验 将嗜肺军团菌各血清型的细菌煮沸杀菌后，用0.5%福尔马林盐水配成适当浓度的悬液，将待测的患者血清在血凝反应板的孔内用缓冲盐水做双倍连续稀释，每孔加与稀释血清等量的菌液，混匀后置湿盒中于室温（18～25℃）过夜。肉眼观察，以出现50%凝集（＋＋）为阳性终点。出现阳性的血清最高稀释倍数的倒数为抗体滴度。

3. ELISA实验 自嗜肺军团菌血清1型费城1株（Philadelphia 1）提取抗原，包被聚苯乙烯反应板微孔。加入待测血清后，如含有抗军团菌抗体，即与孔壁包被抗原结合。洗去未反应物，加入酶标记的抗人IgG（或抗人IgM）抗体，固相上即可形成军团菌抗原-抗军团菌抗体-酶标记抗体的复合物。洗去未反应物，加入酶底物/色原溶液，出现呈色反应，呈色强度反映待测血清中特异抗体水平。本法有定性和定量两种。定性时以待测血清和阴性对照血清吸光度比值（P/N）≥2.1为阳性；定量时以抗嗜肺军团菌抗体标准血清的抗体水平2、20、200任意单位（RU)/ml及其相应吸光度制备标准曲线。由于缺乏足够的敏感性和特异性方面的资料，这种方法虽然已有商品试剂盒，但诊断的临界（cut off）值尚待研究。

［参考值］

各实验室应采用固定的方法（固定种类的试剂盒）对本地区人群进行抗体水平的调查，以得出诊断军团菌病的临界值。

美国CDC推荐IFA法恢复期（4～6周）血清抗体效价较急性期（第1周）滴度有≥4倍升高并≥128时，可作出军团菌病的诊断。如一般人群中抗体水平较低，则单份血清效价≥256也有诊断价值。

［结果分析与临床意义］

1. 军团菌病的免疫学检验在国内大多数医院并未常规开展，因此，这些实验的临床意义和诊断标准基本上还是来自国外的研究资料。

2. 用血清学实验检测抗军团菌抗体，急性期与恢复期血清必须在同一实验条件下同批测定，以减少技术误差。在患病第1周时，25%～40%的患者已有抗体水平升高。恢复期血清的抗体水平不仅要有≥4倍升高，而且效价还应≥128，才能做出军团菌病的诊断。但有少数患者在病后12～24周始终得不到抗体效价升高4倍的结果。

3. 患病过程中如只获得单份血清，用IFA检测时抗体效价≥256才有提示诊断（患军团菌病）的价值。已发现有1%～16%的健康人，IFA测定血清抗嗜肺军团菌抗体效价≥256，这是其他革兰染色阴性杆菌感染引起的交叉反应。

4. 在美国，军团菌病诊断率较高的原因是医院普遍开展军团菌培养和尿

抗原测定。尿抗原实验操作简便，能及时获得结果，每份标本检测的价格 16 美元（低于血清学实验的 21 美元）。虽然本法只能用于 *L. pneumophila* 血清型 1 型感染的诊断，但鉴于≥90%的军团菌病均由该型引起，故此法的临床应用价值还是很高的。只要引进检测用试剂盒，在我国二级以上医院常规开展应该是可行的。

5. 军团菌引起的肺炎与其他病原如肺炎支原体、肺炎衣原体、SARS 冠状病毒等引起的非典型肺炎临床表现十分类似。因此，对临床可疑患者除应进行军团菌的实验室检查外，也应同时进行上述相关病原体的实验室检查，以免贻误诊断。

第十一节 幽门螺杆菌感染

幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*，HP）由 Robin Warren 和 Barry Marshall 于 1983 年首次报告，原称幽门弯曲菌。1989 年 Goodwin 根据其超微结构、形态、菌体脂肪酸组成、脲酶活性以及 DNA-DNA 杂交实验，将其列于螺杆菌属，并改为现名。为了表彰 Warren 和 Marshall 在发现 HP 及阐明 HP 与慢性胃炎、消化性溃疡关系方面的功绩，诺贝尔奖评审委员会将 2005 年度诺贝尔生理学或医学奖授予了他们。

［概述］

1. 幽门螺杆菌（HP） HP 为革兰染色阴性的弯曲状细菌，多呈螺旋形、U 形、S 形；多次传代后呈细长微弯的杆状。一端或两端有 2～6 根鞭毛，运动活泼。微需氧，在 10% CO_2、5% O_2、85% N_2 的环境中生长。对营养要求较高，培养基中需含血液或血清。生化反应不活泼，不能利用糖类，不还原硝酸盐。特点是可产生大量高活性的胞外尿素酶，相当于普通变形杆菌的 20～70 倍。约 67%的菌株产生细胞空泡毒素（vacuolating cytotoxin，Vac）和细胞毒素相关蛋白 A（Cag A）。产毒株 HP 致病性更强。

2. 引起的疾病 全球人群中约 50%有 HP 感染，发展中国家感染率较高，我国为 40%～90%，平均 59%。血清中抗 HP 抗体检出率随年龄增长而升高，儿童期 5%～27%，至>50 岁的成人检出率>70%。年龄每增 10 岁检出率增长 3%～4%。抗 CagA IgG 类抗体检出率为 55.2%～97.2%。Warren 和 Marshall（1983 年）首次报告 HP 与胃炎、胃和十二指肠消化性溃疡的联系。1994 年 2 月，美国国家卫生研究院舆论发布会宣布，HP 是消化性溃疡的主要病因，患者应接受抗菌治疗。同年 6 月，世界卫生组织国际癌症研究机构工作组证实，HP 是人类明确的致癌物，与胃癌的发生有密切关系。感染 HP 2 周

后可发生急性胃炎，多数受染者转为不同类型的慢性胃炎，有些人发生十二指肠炎，约16%的受染者发生十二指肠溃疡。长期HP感染、持续的炎症，导致多灶性萎缩性胃炎（multifocal atrophic gastritis）是胃溃疡和胃腺癌的前期改变。现已确认，HP感染是萎缩性胃炎、胃溃疡病、胃腺癌和胃黏膜相关淋巴组织（MALT）淋巴瘤的独立危险因素。

3. 实验室诊断

（1）侵入性诊断法：通过胃镜钳取胃黏膜活组织，直接涂片染色（革兰染色）后用油镜检查，观察有无典型形态的HP；或作组织切片染色（Warthin-Starry银染，吉姆萨染色，HE染色等），镜检有无HP，此法常用。将活检组织制成悬液后接种专用培养基，进行HP分离培养，因条件要求较高，目前未推荐常规检查。快速尿素酶实验是目前推荐常规开展的项目，HP产生大量细胞外脲酶，将感染HP的胃黏膜活检组织加至含尿素，基质（琼脂或缓冲液）、酚红指示剂等组成的培养基中，脲酶分解尿素产铵，使培养基变成红色。15分钟时观察判定结果阳性率可达67%，3小时判定结果阳性率达90%，24小时判定结果100%阳性。

（2）非侵入性诊断法：

1）基因诊断：用聚合酶链反应（PCR）检测HP的脲酶基因、vacA基因、cagA基因及16s rRNA，可用于诊断有无HP感染，感染的HP菌株是否产生毒素。目前未推荐用于常规检查。

2）尿素呼吸实验（urea breath tests，UBT）：患者服用放射性核素（^{13}C、^{14}C）标记的尿素（膜包被的片剂）后，胃内HP分泌的脲酶可将其水解，形成^{13}C或^{14}C碳酸氢盐，并进而以标记的CO_2进入血循环经肺呼出。收集呼出的气体样品，用仪器（^{14}C用闪烁计数仪、^{13}C用质谱仪或红外线光度计）测定，即可判明有无HP感染。敏感性和特异性95%～100%，是目前诊断HP活动性感染的主要筛查方法。此法已于1996、1997年先后获美国FDA批准。

3）血清学实验：常规开展的为间接免疫荧光实验、ELISA实验和免疫印迹实验，均有商品试剂盒供应。此外还有床边（point-of care）快速免疫学实验金标记免疫渗滤法，可在10分钟内获得结果。

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光实验　将幽门螺杆菌固定于载玻片上制成抗原片，再将不同稀释度的患者血清分别滴加于菌膜上，温育并洗涤。患者血清中抗HP抗体与载玻片上HP结合，待滴加荧光素标记的抗人IgG（或抗人IgA、抗人IgM）抗体时，即可形成HP-抗HP抗体-荧光抗体复合物。洗涤后在荧光显

微镜下观察，可见涂片上的 HP 呈现典型的明亮荧光。呈现阳性的血清最高稀释倍数的倒数为 IgG（或 IgA、IgM）类抗 HP 抗体效价。

2. ELISA 实验　以幽门螺杆菌（ATCC 43504 株）的超声裂解产物或基因重组 Cag A 为抗原，包被聚苯乙烯反应板微孔。将稀释的待测血清加至微孔中，血清中如有抗 HP（或抗 Cag A）抗体即可与固相上相应抗原结合。洗去未反应血清成分，再加入酶（一般用辣根过氧化物酶）标记的抗人 Ig（IgG 或 IgA 或 IgM）抗体，反应并洗涤后加入酶底物/色原溶液呈色。呈色深浅（用吸光度表示）与抗体水平呈正比。定性实验时以待测血清吸光度/阴性对照平均吸光度（P/N）的比值≥2.1 为阳性，<2.1 为阴性；定量实验以抗 HP（或抗 Cag A）抗体不同浓度标准品（2、20、200 RU/ml）为横坐标，相应吸光度值为纵坐标，制作标准曲线。待测血清中抗 HP（或抗 Cag A）抗体水平，可根据测得的吸光度值从标准曲线得出。

3. 免疫印迹实验　用十二烷基硫酸钠（SDS）提取 HP 的全抗原，经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离成按相对分子质量大小依序排列的蛋白质条带，再转印至硝酸纤维素（NC）膜上。将待测血清稀释后加于 NC 膜上，温育后洗涤。如血清中含有抗 HP 抗体，即与 NC 膜上相应的抗原条带结合，无关成分被洗除。在滴加酶（如辣根过氧化物酶）标记的抗人 Ig（IgG 或 IgA 或 IgM）抗体至 NC 膜上并温育洗涤后，膜条浸入酶底物/色原溶液中呈色。根据显色的抗原条带（相对分子质量 120 000 为 CagA，95 000 为 VacA，66 000 为 UreB，29 000 为 UreA，19 000 为 OMP），可判定待测血清中含有何种抗 HP 抗体。本法可作为抗 HP 抗体的确认实验。

［参考值］

健康人血清抗 HP（或抗 CagA）抗体为阴性。

各实验室应调查一定数量的 HP 感染者及无 HP 感染者，得出本实验室间接免疫荧光实验抗 HP 抗体效价或 ELISA 定量实验（RU/ml）的参考值。

［结果分析与临床意义］

1. 免疫学检验因其非侵入性，价格相对便宜，有较高的敏感性和特异性，操作简便，因而是目前 HP 感染的主要实验室筛查方法。各厂家试剂盒检测的平均敏感性 85%（60%～100%），特异性 83%（65%～100%），阳性预测值 95%～100%，阴性预测值 84%～89%。

2. HP 感染后虽然可诱导机体产生 IgG 类、IgA 类、IgM 类抗体，但以 IgG 类抗 HP 抗体水平升高最为显著，其诊断敏感性和特异性也最高。抗 HP IgA 类抗体因敏感性低（39%～82%），不适宜用做初筛实验，但已发现有>7%的血清标本，IgG 类抗 HP 抗体阴性而 IgA 类抗体阳性，故适用于 IgG 类

抗 HP 抗体阴性的 HP 感染高度可疑患者。联合检测抗 HP IgG、IgA 类抗体，可使准确性提高约 10%。

3. 免疫学检验的不足之处是，阳性结果不能说明 HP 感染目前是否仍在进行（活动）。治疗清除 HP 感染后血清抗体水平下降很慢，0.5～1 年约下降 50%，1 年后抗体仍常呈阳性。此外，这类实验也不适用于<10 岁的儿童。

4. 应当注意，在有消化道症状的患者，除 HP 感染外还可能有其他病原菌的单独或与 HP 混合的感染。如 1987 年发现的海尔曼螺杆菌（*Helicobacter heilmannii*，Hh），1996 年发现的葡萄球菌 Leei 100 株（*Staphylococci leei 100*，SL100）。这两种菌都产生脲酶，检测 HP 感染的脲酶相关实验在这两种菌感染时可呈阳性反应，免疫学实验则可加以区别。

第十二节　结　核　病

结核病（tuberculosis）目前是世界范围内一个突出的公共卫生问题。1945 年后，因多种抗结核药问世，在 1953～1985 年间，结核病曾一度得到控制。由于新型抗结核药研发的停滞，耐药结核杆菌的增多以及艾滋病（AIDS）的广泛流行，1990 年以来，结核病在全球又重新蔓延。1997 年以来，每年有 800 万确诊的新病例，其中有 350 万为涂膜阳性（传染性强）的肺结核。2002～2003年至少有 200 万人死于结核，全球病死率为 23%。某些非洲国家结核与 AIDS 并发死亡率>50%。目前，全球结核分枝杆菌感染率为 32%，即约有 19 亿人感染。世界卫生组织预测，如果防控不力，2000～2020 年间还将有近 10 亿人新感染，2 亿人发病，3 500 万人将死于结核。我国是全球 22 个结核高负担国家之一，患者人数居世界第 2 位，仅次于印度。在甲、乙类法定报告传染病中，结核的发病人数和死亡人数均居首位。

［概述］

1. 结核分枝杆菌　分枝杆菌属（*Mycobacterium*）中有多个菌种是重要的致病菌，如结核分枝杆菌复合体（*Mycobecterium tuberculosis complex*）和麻风分枝杆菌（*M. leprae*）。此外，有多种环境中的分枝杆菌称为非结核分枝杆菌（nontuberculous mycobacteria，NTM）。NTM 过去也称为非典型分枝杆菌（atypical mycobacteria）或结核菌以外的分枝杆菌（mycobacteria other than tubercle bacilli），引起各种分枝杆菌病。结核分枝杆菌复合体包括结核分枝杆菌（*M. tuberculosis*）、牛结核分枝杆菌（*M. bovis*，包括 *M. bovis* BCG）、非洲分枝杆菌（*M. africanum*）、田鼠分枝杆菌（*M. microti*）和 *M. canettii*。它们之间 DNA-DNA 的同源性>95%。据报告我国临床分离的分枝杆菌中，结核

分枝杆菌占 86.4%，牛分枝杆菌占 2.5%，非结核分枝杆菌占 11.1%。结核菌的总耐药率为 27.8%，耐多药率为 10.7%。

2. 结核的感染　肺结核患者咳嗽时，结核分枝杆菌由飞沫（droplet nuclei）携带，此飞沫颗粒直径 1～5μm，在空气气流中呈悬浮状态，易感者吸入此飞沫时，结核菌可随之进入肺泡，被肺泡吞噬细胞吞噬。机体的细胞介导的免疫反应可限制结核菌的增殖和扩散，但大部分结核菌仍是活的，可在初染后蛰伏多年。这种潜伏感染的患者通常无症状，也无传染性，但纯化蛋白衍生物（purified protein derivative，PPD）皮试呈阳性反应。潜伏感染的人在其一生中有 10%的风险发生活动性结核。由于免疫功能受到破坏，HIV 感染者中每年有 10%～15%的人会并发活动性结核。

3. 实验室诊断　痰等病理性标本涂片、抗酸染色后显微镜检查和分枝杆菌的分离培养与鉴定，目前仍是结核病实验室诊断的最主要方法。最近 10 余年来，核酸检测技术（PCR 及其衍生技术）已有很大发展，主要用于诊断、菌种鉴定、基因分型和耐药性检测等方面，但目前还有很多不完善之处，不推荐用于常规检测。免疫学实验中最早应用的是结核菌素皮试，其后改用 PPD 皮试。一种在结核分枝杆菌上表达但牛结核分枝杆菌卡介苗（BCG）缺如的 T 细胞抗原 ESAT-6，现也用于迟发型超敏反应皮肤实验。皮试阳性可反映受染者具有较强的细胞免疫功能，缺点是不能区别既往感染与现症活动性结核。最近，美国 FDA 批准了 QFT（Quanti FERON-TB test）和 QFT-G（Quanti FERON-TB gold）两种检测方法，前者是检查 PPD 刺激后干扰素（IFN-γ）的释放情况，后者是用 ESAT-6 和人结核分枝杆菌、致病性牛结核分枝杆菌的培养滤过蛋白 CFP-10 刺激后用 ELISA 测定淋巴细胞释放的 IFN-γ 水平。其临床意义与结核菌素皮试大体相同。第二种免疫学实验是用 ELISA、RIA 以及抗体包被的胶乳颗粒凝集实验检测脑脊液中的分枝杆菌抗原，敏感性 65.8%～100%，特异性 95%～100%，但目前未推荐用于常规检测。第三种免疫学实验是检测血清等体液中抗结核分枝杆菌抗体，已在临床实验室开展，也有商品试剂盒供应，但应用不太广泛。

［免疫学检验］

目前，检测抗结核分枝杆菌抗体的血清学实验方法有酶联免疫吸附实验（ELISA），金标记免疫渗滤法或金标记免疫层析实验，蛋白质芯片（微阵列）技术等。原理都是将结核分枝杆菌的特异抗原〔早年曾用 PPD，目前用的是相对分子质量 38 000、16 000 蛋白质抗原，抗原 60（获自 BCG 的蛋白质多糖和脂质混合物），抗原 85 复合物（antigen 85 complex），脂阿拉伯甘露聚糖（lipoarabinomannan），糖脂（glycolipids）。后者包括苯酚糖脂 Tb1（phenolic

glycolipid Tb1)、二酰基海藻糖（2,3-diacyltrehalose)、脂低聚糖（lipooligosaccharide)〕包被于固相载体，待测血清中的特异抗体可与之结合，再与随后加的酶或胶体金或荧光素标记的抗人 IgG 抗体反应，即可判定待测血清中抗结核分枝杆菌抗体是否存在。

［参考值］

健康人抗结核分枝杆菌抗体为阴性。

［结果分析与临床意义］

1. 结核分枝杆菌是细胞内寄生菌，感染后可诱导机体产生特异性的细胞免疫反应和体液免疫反应。前者可用 PPD 皮肤实验、ELISA 测定细胞因子以及 ELIspot 法测定患者淋巴细胞受特异抗原刺激后产生细胞因子的能力来反映，后者则通过测定循环中抗结核分枝杆菌抗体来反映。

2. 在结核病发病过程中，机体细胞免疫功能和体液免疫功能常发生分离现象：病情越严重、越活动，细胞免疫的检测指标常常转为阴性或水平很低，而抗结核分枝杆菌抗体的水平却显著升高。

3. 抗结核分枝杆菌抗体的敏感性和特异性依试剂盒的不同（用的包被抗原的种类不同）差异很大。如：以脂阿拉伯甘露聚糖、糖脂抗原或相对分子质量 38 000、16 000 蛋白质抗原用于测定时，敏感性为 82%～90%，特异性为 96%～98%；如以抗原 60（A60）为测定抗原时，敏感性仅 36%。

4. 抗结核分枝杆菌抗体测定最适用于痰菌阴性但临床高度怀疑活动性肺结核或肺外结核的辅助诊断与鉴别诊断。不适用于人群中筛查。由于技术、试剂都还未标准化，检测结果还有很多难以解释的问题，其临床意义也还需进一步严格评估。

第十三节　伤寒和副伤寒

伤寒（typhoid）和副伤寒（paratyphoid）是由伤寒沙门菌（*Salmonella typhi*）和甲、乙、丙型副伤寒沙门菌（*S. paratyphi* A，B，C）引起的急性肠道传染病。20 世纪前半世纪，尤其是第二次世界大战时期，伤寒在世界各地发病率很高，由于缺乏特效药，死亡率高达 40%左右。我国在解放后大力开展爱国卫生运动，加强了防治措施，发病率和死亡率都得到了控制，目前国内的总发病率在 10/10 万上下波动，各地仍经常有散发病例发生，一些省（市）、自治区还常出现因水源污染造成的局部暴发流行。由于临床症状和体征已远非上世纪初期那样典型，实验室检查对伤寒、副伤寒的诊断有十分重要的意义。

[概述]

1. 伤寒和副伤寒沙门菌　沙门菌因美国兽医师 Daniel E，Salmon 于 1885 年首次分离到猪霍乱沙门菌而命名。本菌列于肠杆菌科（Enterobacteriaceae）、沙门菌属（*Salmonella*），肠道沙门菌种（*S. enterica*）中的肠道亚种（subsp *enterica*）。除伤寒沙门菌（*S. typhi*）、甲型副伤寒沙门菌（*S. paratyphi* A）仍沿用原名外，乙型副伤寒沙门菌（*S. paratyphi* B）现也有人称为肖氏沙门菌（*S. schottmuelleri*），丙型副伤寒沙门菌（*S. paratyphi* C）也称希氏沙门菌（*S. hirschfeldii*）。

本菌为革兰染色阴性杆菌，无芽胞，无荚膜，有周鞭毛，能运动。不分解乳糖、蔗糖，不能在氰化钾（KCN）肉汤中生长。培养时对营养条件要求不高，在含胆盐培养基中生长良好。本菌具有菌体抗原（O）、鞭毛抗原（H），伤寒和丙型副伤寒杆菌还具有毒力抗原（Vi）。根据菌体和鞭毛抗原的不同，甲型、乙型、丙型副伤寒沙门菌分属于沙门菌血清型 A、B、C 型，伤寒沙门菌属于 D 型。

2. 临床表现　伤寒和副伤寒沙门菌只对人类致病。传染源为患者和带菌者，主要经粪（污染的水和食物）-口途径传播。人群普遍易感，但青少年患者居多，15 岁以下者占 40%～80%。本菌为胞内寄生菌，进入消化道后在小肠繁殖增生，被单核-吞噬细胞吞噬后仍在细胞内继续繁殖，迅速经淋巴、血液进入血流，引起菌血症，并侵入肝、胆、脾、肾、骨髓等重要脏器。临床表现的特点是：高热、虚弱、中毒面容、腹痛、腹胀、腹泻、血便，约 1/3 患者有相对缓脉，半数患者肝、脾大，部分患者在第 7～10 病日于前胸和上腹皮肤出现玫瑰疹。重症患者可并发中毒性脑病、中毒性心肌炎、中毒性肝炎和肠出血、肠穿孔。一般来说副伤寒的临床表现较伤寒轻。有效的抗菌药物应用后，本病死亡率已显著下降。病后一般可获持久的免疫力。

3. 实验室检查　患者白细胞总数偏低，中性粒细胞减少，嗜酸性粒细胞消失。血培养在发病 7～10 天阳性率可达 90%。骨髓培养阳性率更高，适用于已用抗生素治疗血培养阴性者。病后 3～4 周粪便培养阳性率可达 80%，尿培养阳性率可达 25%。目前认为，检出伤寒或副伤寒沙门菌是确诊的唯一依据。血清学实验（测定相应抗体）具有辅助诊断价值。检测标本中的伤寒或副伤寒沙门菌的可溶性抗原（ELISA、乳胶凝集实验等）或核酸（PCR）未推荐用于常规实验室诊断。

[免疫学检验]

目前仍推荐肥达（Widal）反应用于伤寒和副伤寒的常规血清学实验。原理是伤寒沙门菌的菌体抗原标准菌株、鞭毛抗原标准菌株和甲、乙、丙型副伤

寒沙门菌的标准菌株（鞭毛抗原）在电解质溶液中与患者血清中的特异抗体反应时，可发生肉眼可见的细菌凝集。出现阳性凝集反应的血清最高稀释倍数的倒数为抗体效价。传统的肥达反应在试管内进行，现国内多用大孔反应板代替试管，结果分析与参考值两法相同。

［参考值］

健康人抗伤寒沙门菌 O 抗体效价<80，H 抗体效价<160；抗副伤寒沙门菌 H 抗体效价<80。

［结果分析与临床意义］

发病 1 周后，肥达反应开始阳性。当待测血清抗伤寒沙门菌 O 抗体效价≥80、H 抗体效价≥160，抗副伤寒沙门菌 H 抗体效价≥80 有诊断价值。病后第 3～4 周肥达反应阳性率可达 90%；效价随病程递增，第 4～6 周达峰值。恢复期血清较急性期血清效价增高≥4 倍更有诊断价值。

O 抗体（凝集素）为 IgM 类抗体，多在急性期升高，阳性结果提示沙门菌属感染。H 抗体（凝集素）为 IgG 类抗体，可鉴别沙门菌的型别，预防接种后效价可显著升高，持续数年之久，患其他疾病时可能会短暂地重新出现。

第十四节　梅　　毒

梅毒（syphilis）是由梅毒螺旋体（苍白密螺旋体苍白亚种）引起的全球分布的性传播病。在 2006 年一季度国家卫生部公布的 27 种甲、乙类法定报告传染病中，梅毒发病人数高居第 5 位。

［概述］

1. 梅毒螺旋体　属于螺旋体目（Spirochaetales）、螺旋体科（Spirochaetaceae）、密螺旋体属（*Treponema*）、苍白密螺旋体种（*Treponema pallidum*）中的苍白亚种（*T. pallidum subsp pallidum*）。密螺旋体属中已明确对人致病的有以下四种：

（1）苍白密螺旋体苍白亚种，引起性病梅毒，性接触传播。

（2）苍白密螺旋体细弱亚种（*T. pallidum subsp pertenue*），引起雅司（yaws），是热带地区：非洲、南美洲、加勒比海地区、印度尼西亚的一种通过皮肤接触传播的皮肤传染病（溃疡性病损）。

（3）苍白密螺旋体地方性亚种（*T. pallidum subsp endemicum*），引起地方性梅毒（endemic syphilis），发生多发性口咽部黏膜和皮肤病损，流行于干旱地区：北非、中东地区。

（4）品他密螺旋体（*T. carateum*），引起品他（pinta）。是在半干旱的温

暖地区：中美洲、南美洲流行的一种皮肤病损（品他疹）。

除上述已明确的4种病原外，还有一些与人类宿主相关的螺旋体（human host-associated spirochetes）包括寄居于齿龈间隙的牙菌斑（dental plaque）中的口腔螺旋体，如 *T. denticola*（齿垢密螺旋体）、*T. vincentii*（奋森密螺旋体）等；寄居于外阴部皮脂腺分泌物中的皮肤相关的螺旋体，如 *T. phagedenis*（蚀疮密螺旋体）、*T. refringens* 等；肠道螺旋体，如 *Brachyspira pilosicoli*、*Brachyspira aalborgii* 等。这些螺旋体因与梅毒螺旋体有类似的抗原结构，可诱导机体产生与梅毒螺旋体交叉反应的抗体。

2. 临床表现

（1）一期梅毒：硬下疳（溃疡），局部淋巴结肿大。

（2）二期梅毒：全身皮肤黏膜梅毒疹，全身淋巴结肿大。

（3）三期梅毒：梅毒树胶肿，神经系统梅毒，心血管梅毒。

（4）潜伏梅毒：无症状、体征，梅毒血清学实验阳性。

（5）先天梅毒：早期（<2岁）类似二期梅毒；晚期（7～10岁）类似三期梅毒。

3. 实验室诊断

（1）检查梅毒螺旋体：暗视野显微镜检查法，直接荧光抗体检查法。

（2）检查梅毒螺旋体核酸：聚合酶链反应（PCR），尚不够成熟。

（3）梅毒血清学实验：有两种：非密螺旋体抗体实验（nontreponemal antibody test，NTrAT）检查患者体内抗类脂抗体（反应素）；密螺旋体抗体实验（treponemal antibody test，TrAT），检查患者体内针对梅毒螺旋体的抗体。

［免疫学检验］

1. 直接荧光抗体（direct fluorescent-antibody，DFA）检查法　将病理性标本（下疳或梅毒疹分泌物，肿大淋巴结穿刺液，脑脊液离心沉淀物等）涂片、干燥、丙酮固定，用异硫氰酸荧光素（FITC）标记的抗梅毒螺旋体单克隆抗体染色后在荧光显微镜下观察，当检出发特异荧光的形态典型的螺旋体时报告“*T. pallidum* 阳性”。

2. 非密螺旋体抗体实验（NTrAT）　用心磷脂、胆固醇、磷脂酰胆碱（卵磷脂）按适当比例配制成乙醇溶液为抗原，检测患者血清中抗类脂抗体。

（1）VDRL（venereal disease research laboratory，性病研究实验室）实验：待测血清须加热灭活，结果要用显微镜观察，目前仅用于脑脊液检查。

（2）RPR（rapid plasma reagin，快速血浆反应素）实验：是一种环状卡片实验，待测血清不需灭活，脂质抗原经染色与血清中抗体反应后形成黑色凝

集颗粒，肉眼观察结果。

（3）USR（unheated serum reagin，不加热血清反应素）实验：待测血清不必加热灭活，结果需用显微镜观察。

（4）TRUST（toluidine red unheated-serum test，甲苯胺红不加热血清实验）：待测血清不需灭活，脂质抗原经染色与血清中抗体反应后形成红色凝集颗粒，肉眼观察结果。

3. 密螺旋体抗体实验（TrAT） 这类实验以梅毒螺旋体的 Nichols 株或其纯化（或基因重组）抗原制成抗原片或固相抗原载体，检测待测血清中的抗梅毒螺旋体抗体。正式实验前待测血清需用含非致病性密螺旋体 *T. phagedenis* Reiter 株提取物及正常兔血清和兔睾丸提取物的吸收剂，吸除待测血清中的交叉反应抗体。TPHA 所用吸收剂中还含有超声处理的牛 RBC 和羊 RBC 成分以吸除血清中嗜异性抗体。

（1）TPHA（*T. pallidum* hemagglutination assay，苍白密螺旋体血凝实验）：将梅毒螺旋体 Nichols 株的超声处理或十二烷基硫酸钠（SDS）提取的抗原包被经甲醛和鞣酸处理的绵羊红细胞（SRBC），待测血清中的特异抗体与致敏 SRBC 反应，出现肉眼可见的 SRBC 凝集。

（2）TPPA（*T. pallidum* particle agglutination assay，苍白密螺旋体颗粒凝集实验）：原理同 TPHA，用染成红色的明胶颗粒代替醛化 SRBC 包被抗原。吸收剂中可不必含牛、羊 RBC 成分。

（3）ELISA-TP：检查抗 *T. pallidum* 抗体的间接酶联免疫吸附实验。用纯化的或重组的 *T. pallidum* 特异抗原（相对分子质量 15 000、17 000、42 000、47 000 的蛋白质）包被反应板微孔，待测血清（经吸收后）与孔中包被抗原反应并结合，洗去未反应物，加入酶标记抗人 IgG（或抗人 IgM）抗体和酶底物/色原，出现呈色反应。呈色强度与待测血清中抗体水平呈正相关。现也有双抗原夹心 ELISA 试剂盒（用酶标记抗原代替酶标记抗人 IgG）。

（4）FTA-ABS（fluorescent treponemal antibody absorption，荧光素密螺旋体抗体吸收）实验：将梅毒螺旋体 Nichols 株制成涂片，丙酮固定。待测血清经吸收剂吸收后滴片，与 Nichols 螺旋体反应，洗去未反应物后用 FITC-抗人 IgG（或抗人 IgM）抗体染色，此荧光抗体即可与已与 Nichols 螺旋体结合的特异抗体发生结合反应。荧光显微镜检查出现发黄绿色荧光的螺旋体表明待测血清中有特异抗体。最近有一种双染色 FTA-ABS（FTA-ABS double staining）试剂盒，即第一次荧光抗体染色用四甲基异硫氰酸罗丹明标记的抗人 IgG，阳性时螺旋体发红色荧光。出现阴性结果时再用 FITC 标记的抗梅毒螺旋体抗体染色。如果出现发黄绿色荧光的螺旋体，表明阴性结果是由于血清中

没有抗梅毒螺旋体的抗体，而不是因为抗原片上的 Nichols 螺旋体脱落、丢失。

[参考值]

健康人各种 NTrAT、TrAT 测定结果都应为阴性。

[结果分析与临床意义]

1. 直接荧光抗体（DFA）检查法　从病理性标本中直接找到 *T. pallidum*。因为用的是荧光素标记的抗 *T. pallidum* 单克隆抗体，具有抗原抗体反应的特异性，较暗视野镜检法阳性结果的特异性高，是早期（一期、二期）梅毒的确诊指标。最好从多部位取材和进行多次检查以提高阳性率。

2. 非密螺旋体抗体实验　抗类脂抗体可能由螺旋体本身释放的脂质也可能由病损细胞释放的脂质诱导产生，缺乏特异性，常用于梅毒筛查，实验结果阳性时需用密螺旋体抗体实验确认。在一期梅毒初发时，阳性率 70%～90%，很多患者初次测定此类抗体可能为阴性，可间隔 2 周后再次测定。二期梅毒患者阳性率可达 100%。晚期梅毒时阳性率又显著下降（40%～95%）。由于在有效治疗后此类实验可从阳性转化为阴性或效价显著降低，故可用作治疗效果的监测指标。

除梅毒外，自身免疫病（如系统性红斑狼疮、抗磷脂抗体综合征等）、疟疾、新近免疫接种、多种皮肤病、心血管病、结核、麻风、静脉注射毒品、发热疾病、妊娠、HIV 感染、其他性传播病、多次输血、地方性密螺旋体病患者，此类实验也可阳性。

3. 密螺旋体抗体实验　这类实验所测为抗梅毒螺旋体的抗体，特异性较高。但由于健康人或一些非梅毒患者体内经常寄居一些非致病性密螺旋体，可诱导产生交叉反应性抗体，因此，待测血清必须先用含非致病性密螺旋体提取物、兔睾丸（梅毒螺旋体在兔睾丸中繁殖、传代）提取物、兔血清等的吸收剂吸收。一期梅毒阳性率 70%～100%；二期梅毒阳性率 100%；三期梅毒 94%～96%。由于试剂盒价格较贵，这些实验主要在非密螺旋体抗体实验阳性时确认其结果是真阳性还是假阳性；在晚期梅毒阳性率高，故常用于晚期潜伏梅毒、三期梅毒的诊断。治疗后此类抗体效价变化不大，故一般不用于疗效监测。

在自身免疫病（系统性红斑狼疮、盘状狼疮、药物诱导狼疮等），传染性单核细胞增多症，多种皮肤病、心血管病、麻风、老年人、Lyme 病、地方性密螺旋体病患者此类实验也可阳性。

4. 由于目前很多种类的密螺旋体抗体实验市售试剂盒中未配备吸收剂，在一些低危高龄人群中假阳性率偏高。因此，梅毒血清学实验阳性，只提示从

患者血清中查出抗类脂抗体和(或) 抗密螺旋体抗体，患者是否患梅毒，必须结合临床（不洁性史、病史、治疗史、症状与体征）综合分析。

第十五节 莱 姆 病

莱姆病（Lyme disease）也称莱姆疏螺旋体病（Lyme borreliosis），是由不同基因种（gene species）伯氏疏螺旋体引起的人兽共患性全身疾病。本病早在 1909 年就有报告。1977 年 Steere 等在美国康涅狄格州莱姆镇发现青少年中流行一种关节炎，首发症状为蜱叮咬处出现游走性红斑（erythema migrans，EM)。1982 年，Burgdorfer 等从丹敏硬蜱（*Ixodes dammini*）中肠中分离到一种疏螺旋体，可与 Lyme 病患者血清发生免疫反应。1983 年，Steere 和 Burgdorfer 等又从患者血液、脑脊液、皮肤等发现该螺旋体，证实其即 Lyme 病病原。1984 年根据对该螺旋体 DNA 特性的研究，确定其为疏螺旋体属的一个新种，正式命名为伯氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorfer*）。

莱姆病在全球五大洲 30 多个国家均有流行，我国 28 个省、市自治区人群中均有莱姆病感染者，18 个省、市自治区存在莱姆病的自然疫源地。莱姆病已成为我国的主要虫媒传染病之一。

[概述]

1. 莱姆病螺旋体（Lyme disease spirochaete） 即伯氏疏螺旋体，长 10～40μm，宽 0.2～0.3μm，可在含有组织培养液 CMRL1066、牛血清清蛋白第 5 成分等的 BSKⅡ、BSKH 培养基中生长。根据 DNA-DNA 同源性及 16s RNA 序列分析，可将现分离的 1 000 多株伯氏疏螺旋体分成 10 个基因种，现知 *B. burgdorfer* sensu stricto、*B. garinii*、*B. afzelli* 三个基因组对人致病。

伯氏疏螺旋体的主要蛋白质抗原有：

(1) 外表面蛋白（outer surface protein，Osp)：Osp A 含相对分子质量 28 000～32 000 蛋白质；Osp B 含相对分子质量 34 000～36 000 蛋白质；Osp C 含相对分子质量 22 000～25 000 蛋白质等。

(2) 鞭毛蛋白（flagellin，Flag)：相对分子质量 41 000，是感染后最早诱导机体免疫反应的菌体结构蛋白。

(3) 主要膜蛋白（basic membrane proteins，Bmp)：相对分子质量 39 000，其特异抗体是早期感染的血清学标志之一。

(4) 相对分子质量 83 000/100 000 蛋白，可诱导机体产生特异性 IgM/IgG 抗体。

2. 临床表现 伯氏疏螺旋体的宿主动物为鼠、兔、狼、鸟类等野生脊椎

动物和犬、马、牛、羊等家畜，媒介生物为蜱（我国以全沟硬蜱、二棘血蜱等为主）。蜱的幼虫叮刺带菌动物吸血受到感染，待发育至若虫和成虫叮刺其他动物和人时，可将伯氏疏螺旋体随唾液传给人和别的动物。人被蜱叮咬至出现首发症状游走性红斑，中间的潜伏期短至1天，长达180天。临床表现大致分为三期：

（1）Ⅰ期（早期局部性感染）：一般在蜱叮咬后数天至1个月叮咬处出现红斑，逐渐扩大，可达3～68cm（平均15cm）的圆形或椭圆形皮疹，外周有鲜红色边界。中央皮肤可以完好，也可有硬变、疱疹等改变。不经治疗可持续数周或数月自行缓解。

（2）Ⅱ期（早期播散性感染）：发病后数天或数周，病原体广泛扩散，皮肤、血液、脑脊液均可培养出伯氏疏螺旋体，患者出现流感样全身症状，发热、畏寒、全身衰弱无力，头痛、肌痛、关节痛，皮肤多部位出现继发性红斑，神经系统（脑炎、脑膜炎、神经炎）、心脏（心肌炎、传导阻滞）都可发生病变。

（3）Ⅲ期（晚期持续感染）：在游走性红斑发生6～12个月后，反复发作最终形成的肢体萎缩性皮炎、慢性关节炎（多为单关节、大关节）、周围神经炎、亚急性脑炎、慢性心功能衰竭等。

3. 实验室检查　病变标本涂片直接荧光抗体检查或进行伯氏疏螺旋体的分离培养，可发现病原体，但前者由于方法尚不规范、无商品试剂盒，后者由于耗时长（需2～5周）、阳性率低，均不推荐用于常规检查。PCR（或套式PCR、单管套式PCR）不仅能对病变标本中伯氏疏螺旋体的核酸进行检测，还可对感染菌株进行基因种的分类，但由于实验条件要求较高，方法有待规范，目前也未推荐用于常规诊断。血清学实验是唯一实用的常规实验室诊断方法，最常用的是间接免疫荧光实验，酶联免疫吸附实验（ELISA）和免疫印迹实验。

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光实验　将伯氏疏螺旋体的3个基因种〔*B. burgdorfer sensu stricto*（CH株或USA株），*B. garinii*，*B. afzelli*〕的培养物制成抗原薄片，将待测血清自1∶10（测IgM类抗体）、1∶100（测IgG类抗体）开始倍比稀释，稀释的血清分别滴加于抗原片上，温育、洗涤后滴加荧光素标记的抗人IgM（或抗人IgG）抗体，温育、洗涤，抗原片上形成伯氏疏螺旋体-特异抗体（IgM类/IgG类）-荧光抗体（抗人IgM/抗人IgG）复合物，用荧光显微镜检查时，涂片上所有的螺旋体都呈现典型荧光，以螺旋体能清晰分辨、荧光强度1＋为阳性，出现阳性结果的血清最高稀释倍数的倒数为效价。单份血

清效价 IgM 类抗体≥64、IgG 类抗体≥128，或恢复期血清较急性期血清抗体效价有≥4 倍升高有诊断价值。

2. 间接 ELISA 实验 将 SDS（十二烷基硫酸钠）提取的伯氏疏螺旋体 3 个基因组的全抗原或 *B. burgdorfer* sensu stricto 的基因重组抗原（VIsE）包被聚苯乙烯反应板微孔，加入酶标记的抗人 IgG（或抗人 IgM）抗体，温育、洗涤，固相上形成伯氏疏螺旋体抗原-特异抗体（IgM 类/IgG 类）-酶标记抗体（抗人 IgM/抗人 IgG），待加入酶底物/色原溶液时即产生呈色反应，呈色强度（用吸光度表示）与待测血清中抗体水平成正比。定量实验时将抗伯氏疏螺旋体抗体标准品（抗体浓度 2、20、200 RU/ml）与待测血清同时检测，以抗体浓度为横坐标，所测相应吸光度为纵坐标，制备标准曲线，待测血清中抗体浓度可根据测得的吸光度从标准曲线得出。

3. 免疫印迹实验 将伯氏疏螺旋体 3 个基因组的 SDS 提取全抗原（有的还要加重组抗原 VIsE）经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转印至硝酸纤维素膜（或 PVDF 等其他膜）上。待测血清 1∶51 稀释后与膜条共育，血清中特异抗体与膜条上各蛋白质抗原条带结合，清洗后再加入酶标记抗人 IgM（或抗人 IgG）抗体反应，洗涤后将膜条浸入酶底物/色原溶液中，有特异抗体结合的抗原条带即可呈色。美国疾病控制中心（CDC）的判定标准是：IgM 类抗体，在相对分子质量 24 000（或 25 000）条带（即 OspC）、39 000 条带（BmpA）、41 000 条带（Flag）中有 2 条呈色为阳性；IgG 类抗体，在相对分子质量 18 000条带、21 000/22 000 条带、28 000、30 000、39 000、41 000、45 000、58 000、66 000、83 000（93 000）条带中有 5 条呈色为阳性。

［参考值］

健康人抗伯氏疏螺旋体抗体阴性（间接免疫荧光法 IgM 类抗体效价<64，IgG 类抗体<128；ELISA 定性实验 P/N 比值<2.1，定量实验参考值待定）。疫区与非疫区的实验室，最好通过调查了解当地人群中抗体的基线水平，建立自己的参考值。

［结果分析与临床意义］

中国疾病预防控制中心 1990 年拟订的莱姆病诊断标准为：

（1）发病前数天至数月曾到过疫区，有蜱暴露或叮咬史。

（2）有典型的皮肤损害，游走性红斑直径应>3cm。

（3）有神经系统损害，如脑膜脑炎、脑神经炎（特别是面神经麻痹）、神经根炎等。

（4）有心脏损害（特别是高度房室传导阻滞）且能排除其他病因。

（5）有单个或多个关节炎。

（6）伯氏疏螺旋体检查阳性，或血清中抗伯氏疏螺旋体抗体阳性。

在莱姆病疫区凡具备上述（1）、（2）条者即可做临床诊断，具有（1）、（6）条及（2）～（5）条中≥1 条者可确诊为莱姆病。在非疫区，必须同时具有（2）、（6）两条或（6）条加（3）～（5）中的任何 2 条方可确诊为莱姆病。

第十六节 肺炎支原体感染

肺炎支原体引起的主要疾病是非典型肺炎（atypical pneumonias）、咽炎及气管支气管炎。刘又宁等对 2003～2004 年期间城市成人社区获得性肺炎（community-acquired pneumonias，CAP）患者 665 例进行病原学分析，在完成检测的 610 例中，肺炎支原体单独或混合感染所致 CAP 占 20.7%，超过肺炎链球菌所致 CAP（10.3%）。欧洲 10 国调查发现，肺炎支原体所致 CAP 发病率为 1%～36%不等。

［概述］

1. 肺炎支原体　归于柔膜体纲（Mollicutes）、支原体目（Mycoplasmatales）、支原体科（Mycoplasmataceae）。本科有两个属：Ⅰ属（Genus Ⅰ）为支原体属（*Mycoplasma*），共有 105 种，其中 13 种由人体分离，明确对人致病的为肺炎支原体（*M. pneumoniae*）、人型支原体（*M. hominis*）、生殖支原体（*M. genitalium*）、发酵支原体（*M. fermentans*）。Ⅱ属（Genus Ⅱ）为脲原体属（*Ureaplasma*），有包括解脲脲原体（*U. urealyticum*）在内的 7 个种。肺炎支原体是一种无细胞壁的原核微生物，能在无生命的人工培养基上生长繁殖，能通过细菌滤器。附着于人呼吸道细胞是肺炎支原体定居和感染的先决条件。P1 黏附素蛋白、纤毛停滞和慢性炎症都参与了这一过程。

2. 临床表现　肺炎支原体所致 CAP 以年轻成人和较大儿童患者居多，但近来发现 2 岁儿童和老年人发病率也很高。潜伏期 14～21 天，起病一般缓慢，约 1/3～1/2 患者无特殊症状。常见的临床表现为干性咳嗽、发热、全身不适、无力感、肌痛、腹泻等。X 线胸片主要表现为间质性浸润。

3. 实验室检查　约半数患者外周血白细胞总数和分类都在正常范围。血沉（ESR）加速，C 反应蛋白（CRP）水平可升高，痰涂片革兰染色可见中性粒细胞较多，但细菌很少。肺炎支原体刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞，产生与各种宿主组织和红细胞上的 I 抗原反应的自身抗体，冷凝集素（cold agglutinine）。含有冷凝素的患者血清，可在 4℃凝集人的 O 型红细胞，效价 64～128 或恢复期血清滴度较急性期血清效价增高≥4 倍提示新近有肺炎支原体感染。由于敏感性仅 50%左右，而且病毒感染、胶原血管病患者也可产生冷凝

素，故此实验已不推荐用于肺炎支原体感染的诊断。

培养（肺炎支原体在专用培养基上可长成油煎鸡蛋样菌落）与核酸诊断（PCR）可用于测定呼吸道标本中是否有肺炎支原体存在，但因急性感染后肺炎支原体可在体内持续存在长短不同的时间，培养或 PCR 阳性的临床意义难以评价，因此，也不推荐用于临床常规检查。

肺炎支原体有脂质抗原和蛋白质抗原，感染后可诱导机体产生特异性抗体，通常在病后 1 周左右即可测出，峰值在病后 3～6 周，以后逐步下降。

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光实验　将肺炎支原体感染的细胞固定在载片上，以未感染细胞为对照。待测血清稀释后分别滴加于细胞片上，温育并洗涤，特异性的抗肺炎支原体抗体（IgG 类）即可与感染细胞内肺炎支原体抗原结合，待滴加荧光素（如异硫氰酸荧光素）标记的抗人 IgG 抗体时，即可在载片上形成肺炎支原体抗原-特异抗体-荧光素标记抗人 IgG 抗体的复合物。洗去多余的荧光抗体，用荧光显微镜观察，感染肺炎支原体的细胞胞浆内出现典型荧光图像，而未感染细胞不出现荧光，即为阳性。呈现阳性结果的血清最高稀释倍数的倒数为抗体效价。

2. ELISA 法　将肺炎支原体抗原（常用 Mac ATCC 15531 株的去垢剂提取物）包被于聚苯乙烯反应板微孔上，按操作程序依次加入稀释的待测血清，温育、洗涤，加酶标记抗人 IgG（或抗人 IgA、抗人 IgM）抗体，温育、洗涤，加入酶底物/色原溶液呈色。待测血清中如含有抗肺炎支原体抗原的特异抗体，在固相上即可形成抗原-特异抗体-酶标记抗人 IgG（或抗人 IgA、抗人 IgM）抗体复合物，与酶底物/色原反应后的呈色强度可反映待测血清中特异抗体的水平。定量实验时，以抗肺炎支原体抗体标准品（分别含抗体浓度任意单位 2、20、200 RU/ml）及其相应吸光度制备标准曲线，待测血清中抗体浓度可根据测得的吸光度从标准曲线得出。

［参考值］

1. 间接免疫荧光实验　正常人抗肺炎支原体抗体阴性。

2. ELISA 定性实验　正常人抗肺炎支原体抗体阴性（待测血清吸光度与阴性对照血清吸光度比值<2.1）。

3. ELISA 定量实验　参考值待确定，或用试剂盒提供的参考值。

各实验室最好用本室使用的方法和试剂盒，调查一定数量的正常人群，建立自己的参考值。

［结果分析与临床意义］

肺炎支原体感染所致的非典型肺炎，无特征性的临床症状与体征，故特异

性的病原学诊断必须依赖免疫学检验。

通常感染并出现症状后 1 周内即可测出 IgM 类抗肺炎支原体抗体，10～30 天可达峰值。年轻患者 IgM 类抗体检出率高。IgG 类抗体一般出现较迟，峰值常在感染后 5 周，效价较急性期升高≥4 倍有诊断意义，敏感性一般高于 IgA 类或 IgM 类抗体。

鉴于引起非典型肺炎的常见病原体还有嗜肺性军团菌、肺炎衣原体、SARS 冠状病毒等，因此，对这类患者也应同时进行上述病原的免疫学检验，以资鉴别并避免延误诊断。

第十七节 肺炎衣原体感染

第 1 株肺炎衣原体是 1965 年用鸡胚卵黄囊接种法从一名台湾儿童眼结膜标本中分离的，命名为 TW-183 株。1983 年从美国一患咽炎的大学生分离得到第 1 个呼吸道株命名为 AR-39 株。由于两株的抗原性相同，故合称为 TWAR 株。1989 年 TWAR 被正式确认为衣原体属的第 3 个种即肺炎衣原体。

肺炎衣原体也是引起非典型肺炎（atypical pneumonias）的主要病原之一。欧洲 10 个国家对 5 961 例社区获得性肺炎（community-acquired peneumonias，CAP）进行前瞻性研究发现，三种主要非典型肺炎病原体：肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺性军团菌所致肺炎的发生率依次为 3%～22%，1%～36%和 1%～16%。在我国刘又宁等对 665 例城市成人 CAP 调查结果，肺炎衣原体检出率为 6.6%。

［概述］

1. 肺炎衣原体　属于衣原体目（Chlamydiales，与立克次体目共列于裂殖菌纲中），衣原体科（Chlamydiaceae）、衣原体属（*Chlamydia*）。该属有 4 个种：沙眼衣原体（*C. trachomatis*）、鹦鹉热衣原体（*C. psittaci*）、肺炎衣原体（*C. pneumoniae*）和牲畜衣原体（*C. pecorum*）。近几年经对 16s 和 23s rRNA 基因序列分析，提出了新的分类，衣原体科内分成两个属（1）衣原体属（*Chlamydia*）；包括沙眼衣原体和鼠衣原体新种（*C. muridarum*）、猪衣原体新种（*C. suis*）；（2）亲衣原体属（*Chlamydophila*）：包括肺炎衣原体、牲畜衣原体、鹦鹉热衣原体、流产衣原体（*C. abortus*）、豚鼠衣原体（*C. caviae*）、猫衣原体（*C. felis*）。肺炎衣原体和其他衣原体均为专性细胞内寄生菌，在细胞内有原生小体（原体，elementary body）和网状小体（reticulate body，又称始体）两种形式，可形成胞浆内包涵体（由原体和始体组成）。肺炎衣原体的原体是发育成熟的衣原体，呈多形性，多为梨形，直径

200～350nm，革兰染色阴性，Giemsa 染色呈深紫色卵圆形；Gimenez 和 Macchiavello 染色呈红色。可在鸡胚卵黄囊内生长、繁殖，最适生长的细胞是 HL 细胞和 Hep-2 细胞。

2. 临床表现　过去认为人是肺炎衣原体唯一宿主，现知也感染其他动物，如考拉（koalas）和蛇（snakes）。患者和无症状带菌者是传染源。传染途径是通过呼吸道分泌物在人-人间传播。潜伏期为数周，比其他呼吸道病原所致感染的潜伏期长。最常引起人类呼吸道感染（咽炎、鼻窦炎、支气管炎和肺炎），成人中约 10%的肺炎、5%的支气管炎和鼻窦炎由肺炎衣原体引起。70%～90%的感染为亚临床表现，无特征性的临床症状和体征。所致肺炎一般较轻，但恢复很慢。一般不发热，早期常有咽炎，有时有声音嘶哑，多有全身不适和干性咳嗽，可持续多周。除呼吸道感染外，用电镜、免疫组化和聚合酶链反应（PCR）法已从冠状动脉、颈动脉、主动脉粥样硬化斑块中发现了肺炎衣原体或其 DNA，故认为肺炎衣原体也参与了动脉粥样硬化的发病。

3. 实验室检查　患者外周血白细胞总数和分类一般正常，血沉（ESR）可增速，C 反应蛋白（CRP）水平可升高，痰涂片革兰染色细菌一般很少。病原体的分离常采用细胞（Hep-2、HL）培养法，在专用培养基中细胞生长于盖玻片上，接种标本后 48 小时取出细胞片，用单克隆抗体作直接或间接荧光抗体染色，在荧光显微镜下观察细胞内肺炎衣原体包涵体。此法需在专业实验室进行，条件要求较高，不推荐用于常规检查。用 PCR 或套式 PCR 检测肺炎衣原体特异核酸（编码主要外膜蛋白 MOMP 的基因，编码富含半胱氨酸的相对分子质量 60 000 蛋白质的基因，16s RNA，以及 *Pst* Ⅰ酶切的 474 bp 核酸片段等）有助于肺炎衣原体感染的快速诊断，但方法尚待规范。目前用于临床诊断的常规方法是用间接免疫荧光法或间接 ELISA 法测定抗肺炎衣原体抗体，国内已有商品试剂盒供应。

［免疫学检验］

1. 间接免疫荧光实验　用标准菌株（如 CDC/CWL-029 株）感染易感细胞（如 Hep-2、HL 细胞），洗涤固定后制成抗原片。测试时在抗原片上细胞涂膜区分别滴加不同稀释度的待测血清，温育、洗涤后再滴加荧光素标记的抗人 IgG（或抗人 IgM）抗体，温育、洗涤后用荧光显微镜检查，阳性时感染细胞胞浆中肺炎衣原体包涵体可产生特异性荧光。以出现阳性结果的血清最高稀释倍数的倒数为抗体效价。

2. 间接 ELISA 实验　用肺炎衣原体 CDC/CWL-029 株感染 HL 细胞，以细胞裂解产物为抗原，包被聚苯乙烯反应板微孔，在加入稀释的待测血清时，血清中如存在抗肺炎衣原体抗体即可与包被抗原结合。洗去未反应血清成分，

加入酶标记的抗人 IgG（或抗人 IgA、抗人 IgM）抗体，温育和洗涤后，固相上可形成肺炎衣原体抗原-特异抗体-酶标记抗人 Ig 抗体的复合物，在加入酶底物/色原溶液时，即可产生呈色反应，呈色强度与待测血清中抗体水平呈正比。ELISA 法可进行待测血清中抗体水平的定量。方法是用抗肺炎衣原体抗体的标准品（2、20、200 RU/ml）同法进行检测，以抗体浓度为横坐标、检测所得的相应吸光度为纵坐标，制备标准曲线。待测血清中的抗体浓度可根据测得的吸光度从标准曲线获得。

［参考值］

理论上完全健康的人血清中抗肺炎衣原体抗体应为阴性。不同试剂盒的参考值常不同。每个实验室最好根据自己所用的测定方法和试剂盒调查一定数量的正常人群，得出自己的参考值。

［结果分析与临床意义］

在用间接免疫荧光实验测定时，恢复期血清较急性期血清滴度升高≥4倍，或 IgM 类抗体效价≥32、IgG 类抗体效价≥512 可诊断为现症急性感染。既往感染的诊断指标是 IgG 类抗体效价 8～256。ELISA 法阳性结果的判断则必须依据试剂盒提供的参考值。

一般来说，青少年感染肺炎衣原体常为初次感染，约在 3 周左右可测出 IgM 类抗体，6 周左右测出 IgG 类抗体。年龄较大的成年人常为再次感染，一般 IgM 类抗体较少出现，多在 6 周前后出现 IgG 类抗体。

通过对人群抗体阳性率的研究发现，肺炎衣原体的感染在全球广泛分布。学者们认为，事实上可能每个人在某个时候都已感染过肺炎衣原体，而且再感染又十分普遍，所以每个人在其一生中都受到过此种病原体的感染和再感染。

国外学者 Boman 等用套式 PCR 检查冠状动脉造影证实的冠心病患者外周血白细胞（PBMC），肺炎衣原体 DNA 阳性率高达 59%（60/101）；中年献血员的 PBMC 中检出率为 46%（24/52）。国内学者也有类似发现。提示肺炎衣原体的靶器官不仅仅是呼吸道。因此，在评估抗肺炎衣原体抗体对呼吸道感染的诊断价值时，必须结合临床资料综合分析。在鉴别非典型肺炎的致病原因时，除测定抗肺炎衣原体抗体外，还必须同时进行嗜肺军团菌、肺炎支原体、SARS 冠状病毒感染的免疫学检验，以免延误诊断。

第十八节　日本血吸虫病

血吸虫病（schistosomiasis）是指血吸虫成虫寄生于人体静脉系统引发的一种寄生虫病。基本病理改变是血吸虫虫卵沉积于肝、肠等组织中引起虫卵肉

芽肿并随后发生纤维化。我国流行的是日本血吸虫病，在我国流行的历史可远溯至 2100 年前，因为出土的西汉古尸内即发现有典型的血吸虫卵。20 世纪 60 年代前，我国血吸虫病流行十分猖獗。长江流域以及南方 12 个省（区）、市的 409 个县、市（区）感染血吸虫者 1 200 万人，耕牛 120 万头。经过 40 多年的大规模防治，已有 5 个省（区）、市的 238 个县（市）达到消灭血吸虫标准，52 个县（市）达到基本消灭标准。2002 年全国血吸虫病患者总人数约 81 万。但血吸虫病是一种极易反复的人兽共患自然疫源性疾病，影响其传播和流行的自然因素和社会因素十分复杂，监控措施稍一放松就会引起疫情的反复。感染血吸虫的人和家畜是造成流行的主要传染源。我国血吸虫病防治策略目前是“以化疗为主导的综合防治”，及时、准确的发现病人是防治工作的重要环节。

［概述］

1. 日本血吸虫　血吸虫又称裂体吸虫或住血吸虫。属于吸虫纲（Trematoda）、复殖目（Digenia）、裂体科（Schistosomatidae）、裂体属（*Schistosoma*）。本属 19 个种中寄生于人体的有 6 种，即日本血吸虫（*S. japonicum*）、埃及血吸虫（*S haematobium*）、曼氏血吸虫（*S. mansoni*）、间插血吸虫（*S. intercalatum*）、湄公血吸虫（*S. mekongi*）和马来血吸虫（*S. malayensis*）。日本血吸虫主要分布在中国、日本、印尼和菲律宾，雌雄异体，合抱寄生于终宿主（人、畜）肠系膜静脉和门静脉处。成虫交配产卵，卵沉积于肝、肠组织中，部分进入肠道随粪排出。虫卵中毛蚴在水中数小时即可孵出，进入中间宿主钉螺，发育成尾蚴逸入水中。人在接触疫水时尾蚴可钻入皮肤，进入静脉或淋巴管，最终寄居于肠系膜上、下静脉，门静脉，痔上静脉发育成成虫。

2. 临床表现　可分为急性、慢性和晚期三种类型。

（1）急性血吸虫病：大量尾蚴侵入后 5～8 周后发病。接触疫水后不久，局部出现丘疹、瘙痒（尾蚴性皮炎），2～3 天内消失。发病时有畏寒、发热、多汗、肝脾和淋巴结肿大，可有恶心、呕吐、腹泻、脓血便，重症者有神经系统症状、贫血和腹腔积液等。

（2）慢性血吸虫病：普通型患者常无症状或体征，少数可有肝、脾大、或有腹痛、腹泻。肝、脾大型患者可有肝脾大（肝左叶肿大明显），间歇性腹泻，病程长者有消瘦、乏力症状。

（3）晚期血吸虫病：患者长期反复感染或未经有效治疗，以肠壁组织和肝脏纤维化、门静脉高压综合征为特征，表现有肝脾大、上消化道出血、下肢水肿、腹壁静脉曲张、腹腔积液、肝性脑病等多种晚期症状和体征。此外我国血吸虫病患者合并乙型肝炎病毒感染的比例很高；肺型和脑型血吸虫病患者相关脏器功能障碍的症状较为突出。

3. 实验室检查

（1）病原检查：粪便直接涂片、沉淀浓缩涂片查找血吸虫卵；粪便在清水中混匀，置20～30℃微弱光照环境中观察毛蚴孵化；对慢性或晚期血吸虫病患者，从粪便中检出虫卵困难，可用直肠乙状结肠镜检查肠黏膜病变，钳取病灶处黏膜，夹于两载玻片间于显微镜下观察有无虫卵。这些都是沿用多年的传统方法。

（2）免疫学检查：检测患者血清中抗血吸虫循环抗体有环卵沉淀实验、ELISA实验、金标记免疫层析实验等；检测血吸虫循环抗原有ELISA实验等。目前需解决试剂的规范化问题。

（3）一般检验：患者外周血中嗜酸性粒细胞显著增多，贫血，血小板减少，肝功能和肝纤维化指标异常。

［免疫学检验］

1. 环卵沉淀实验（circumoval precipitation test，COPT） 成熟虫卵内毛蚴的分泌物和排泄物能从卵壳上的微孔渗出，当虫卵与待测血清共育，如血清中含有特异抗体，虫卵周围即可出现泡状、带状、指状或菊花状沉淀物，沉淀物直径>10μm（约2个红细胞）为阳性反应。如再滴加酶标记抗人免疫球蛋白抗体和酶底物/色原溶液，使出现呈色反应，结果更为清晰。观察100只成熟虫卵，计数阳性反应虫卵数，得出环沉率（%）。环沉率≥5%判为COPT阳性，环沉率1%～4%为可疑阳性。

2. ELISA实验 用纯化的日本血吸虫成虫抗原或虫卵可溶性抗原（SEA）包被聚苯乙烯反应板微孔，加入稀释的待测血清，温育后血清中特异性抗体（IgM类或IgG类）可与抗原结合，洗除无关成分后加入酶标记抗人IgM（或抗人IgG）抗体，温育后固相上形成血吸虫抗原-抗血吸虫抗体（IgM或IgG）-酶标记抗人IgM（抗人IgG）抗体的复合物，洗除未反应物，加入酶底物/色原溶液，出现呈色反应。呈色强度反映待测血清中抗血吸虫抗体水平。

3. 测定血清中血吸虫抗原的ELISA实验 通常是用双抗体夹心ELISA法。用1株单克隆抗体包被聚苯乙烯反应板微孔，另1株单克隆抗体制成酶标记物，加入待测血清并温育，洗涤后，固相上形成抗血吸虫抗原单抗-血吸虫抗原（待测血清）-酶标记抗血吸虫抗原单抗的复合物，加入酶底物/色原溶液产生呈色反应，呈色强度与待测血清中血吸虫循环抗原水平成正比。

［参考值］

健康人抗血吸虫抗体、血吸虫循环抗原均为阴性。COPT环沉率<1%；ELISA测抗体、抗原实验P/N（待测血清吸光度/阴性对照吸光度）比值<2.1。

[结果分析与临床意义]

1. 我国很多地区血吸虫病流行已基本得到控制，疫区人群血吸虫感染率和感染程度均显著降低，临床表现常不典型，单纯采用病原检查法已不能满足普查普治的需要。免疫学检验方法的建立对非典型病例的确诊有重要价值。

2. 环卵沉淀实验测定抗血吸虫抗体的敏感性可达 94%～100%，假阳性率仅 2.5%～5.6%，目前已可用冻干虫卵代替新鲜虫卵，因此操作简便，价格较其他方法低廉。但此法所测抗体转阴性时间太长（半年阴转率 31%，1 年半 40%，3 年才达 82.5%），不利于观察治疗效果。无血吸虫病史者，距末次治疗>3 年的血吸虫病患者，如环沉率≥3%，可给予治疗。ELISA 法检查抗血吸虫抗体的敏感性 90%～100%，特异性 97.7%～98.7%。有效治疗后 IgG 类抗体在治愈 6～8 个月时效价仍高于正常水平，IgM 类抗体效价则降至正常水平以下。用 ELISA 法测定血吸虫循环抗原阳性时，表明为活动性感染，阴性结果提示感染已终止。因此，此实验对血吸虫病的诊断和治疗效果的判定都有重要意义。慢性轻度感染患者，此法敏感性 60%～81%。治疗 1 年后 90%患者循环抗原转为阴性。